

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jeannine YON

1^{re} Thèse. — Action de quelques cations dans les réactions
de protéolyse.

2^e Thèse. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 24 Mars 1955 devant la Commission d'Examen.

MM. R. WURMSER *Président,*

CI. FROMAGEOT
M^{lle} Y. CAUCHOIS } *Examineurs.*

BESANÇON

IMPRIMERIE JACQUES ET DEMONTROND

1955

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jeannine YON

1^{re} Thèse. — Action de quelques cations dans les réactions
de protéolyse.

2^e Thèse. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 24 Mars 1955 devant la Commission d'Examen.

MM. R. WURMSER *Président,*

CI FROMAGEOT
M^{lle} Y. CAUCHOIS *Examineurs.*

BESANÇON
IMPRIMERIE JACQUES ET DEMONTROND
1955

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen..... J. PERES.

PROFESSEURS

G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	LAPORTE	T Physique générale et radioactivité
E. DARMOIS	T Enseignement de Physique.	JANET	T Mécanique analytique et mécanique céleste.
R. LÉVY	T Physiologie comparée.	PETIT	T Biologie maritime.
FOCH	T Mécanique physique et expérim.	QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique.
PAUTHENIER	T Electrotechnique générale.	GALLIEN	T Embryologie.
DE BROGLIE	T Théories physiques.	EICHHORN	T Biologie végétale (P.C.B.).
JOB	T Chimie générale.	DE CUGNAC	T Biologie végétale (P.C.B.).
PRENANT	T Anatomie et histologie comparées.	M ^{lle} CAUCHOIS	T Chimie physique.
GARNIER	T Géométrie supérieure.	THELLIER	T Physique du globe.
PERES	T Mécanique des fluides et applications.	AUDUBERT	T Electrochimie.
LAUGIER	T Physiologie générale.	L'HÉRITIER	T Génétique.
M. CURIE	T Physique (P.C.B.).	GRIVET	T Radioélectricité.
BARRABE	T Géologie structurale et géologie appliquée.	PONCIN	T Mécanique des fluides.
G. DARMOIS	T Calcul des probabilités et physique mathématiques.	THIRY	T Mécanique appliquée.
J. BOURCART	T Géographie physique et géologie dynamique.	DUBREIL	T Arithmétique et théorie des nombres.
M ^{me} JOLIOT-CURIE ..	T Physique nucléaire et radioactivité.	QUELET	T Chimie organique.
PLANTEFOL	T Botanique.	CAGNIARD	T Géophysique appliquée.
CABANNES	T Recherches physiques.	CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire.
GRASSÉ	T Evolution des êtres organisés.	CUVILLIER	T Géologie structurale et géologie appliquée.
PRÉVOST	T Chimie organique.	JUNG	T Pétrographie.
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la géométrie.	TRILLAT	T Chimie physique.
CHAUDRON	T Chimie appliquée.	WIEMANN	T Chimie (M.P.C.).
WYART	T Minéralogie.	JACQUINOT	T Spectroscopie et physique céleste
TEISSIER	T Zoologie.	VASSY	Physique de l'atmosphère.
MANGENOT	T Biologie végétale.	DESTOUCHES	Théories physiques.
P. AUGER	T Physique quantique et relativité.	M. PRUVOST	T Géologie.
MONNIER	T Physiologie des fonctions.	AMIEL	T Chimie (P.C.B.).
PIVETEAU	T Géologie.	HOCART	T Minéralogie.
ROCARD	T Physique (E.N.S.).	J. P. MATHIEU	T Physique (P.C.B.).
H. CARTAN	T Mathématiques (E.N.S.).	COUTEAUX	Biologie animale (P.C.B.).
LAFFITTE	T Chimie générale.	MAY	Biologie animale (P.C.B.).
FAVARD	T Mécanique générale.	CHOQUET	T Calcul différentiel et intégral.
COULOMB	T Physique du globe.	FELDMANN	Biologie (P.C.B.).
M ^{lle} COUSIN	T Biologie animale (P.C.B.).	GUINIER	T Physique (P.C.B.).
CHRÉTIEN	T Chimie minérale.	JOST	T Biologie (P.C.B.).
P. DRACH	T Zoologie.	FORTET	Calcul des probabilités.
KASTLER	T Physique.	SCHWARTZ	T Méthode mathématique de la physique.
EPHRUSSI	T Génétique.	CHOUARD	T Physiologie végétale.
WURMSER	T Biologie physico-chimique.	MALAVARD	T Aviation.
RIVIÈRE	T Géologie (S.P.C.N.).	BRELOT	T Calcul différentiel.
GAUTHERET	T Biologie végétale.	NORMANT	T Chimie (P.C.B.).
LUCAS	T Physique.	BENARD	Chimie (P.C.B.).
A. THOMAS	T Biologie cellulaire.	BUVAT	Botanique (E.N.S.).
ARNULF	T Optique appliquée.	DUCUE	Statistiques mathématiques.
MAX MORAND	Physique.	GELOSO	Chimie (P.C.B.).
SOLEILLET	T Physique.	SOULAIRAC	Psychophysiologie.
FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides.	ULRICH	Physiologie végétale.
DANJON	T Astronomie.	MARÉCHAL	Optique théorique et appliquée.
FROMAGEOT	T Chimie biologique.	KIRRMANN	T Théories chimiques.
		CHADEFAUD	Botanique.
		DESTRIAU	Physique M.P.C.
		M ^{lle} LE BRETON ..	Physiologie générale.
		SALEM	Mathématiques générales.

Secrétaire général..... Ch. MONIER.



A mon Maître,
MONSIEUR RENÉ WURMSER,
Professeur à la Sorbonne

HOMMAGE DE MA PROFONDE RECONNAISSANCE

AU DOCTEUR J. LEWIN,

Directeur Scientifique du Centre National de la Transfusion Sanguine

EN TÉMOIGNAGE DE TOUTE MA GRATITUDE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552212_0069

Je remercie M. le Professeur FROMAGEOT, mon « parrain », qui a porté un intérêt constant à mon travail.

Mes remerciements vont également à M^{lle} CAUCHOIS, Professeur à la Sorbonne, qui a bien voulu accepter de faire partie de mon jury.

Je tiens à remercier tous les membres du Laboratoire de Biologie Physico-Chimique, pour l'atmosphère cordiale si favorable au travail qu'ils ont su y créer. Je suis particulièrement reconnaissant à M^{me} F. LABEYRIE qui, poursuivant des recherches analogues sur un sujet voisin, m'a sans cesse entretenue du progrès de son travail et suggéré d'utiles développements, à M^{lle} S. GUINAND et à M. J. TONNELAT pour les nombreuses discussions que nous avons eues.

INTRODUCTION

Il résulte d'un ensemble de travaux relativement récents qu'il existe plusieurs types de liaisons entre un ion et une protéine, allant de la simple attraction coulombienne à la formation d'un complexe stable du type chélate. Avec les ions alcalino-terreux, la force de liaison est assez faible, il semble que l'on a principalement des liaisons salines. Mais ce type de liaison peut tout aussi bien entraîner des variations profondes dans les propriétés de la protéine par suite d'un changement dans la répartition des charges et dans l'hydratation de la molécule.

On comprend donc que, par suite d'une combinaison avec un ion, l'activité d'un enzyme soit susceptible de subir de profondes modifications. Des changements peuvent se manifester dans des sens assez différents. L'étude cinétique fera apparaître

soit des variations d'affinité de l'enzyme pour son substrat, soit des variations dans l'énergie et l'entropie d'activation.

Dans les réactions de protéolyse, le problème est particulièrement complexe, puisque deux protéines sont en présence : l'enzyme et le substrat. Les possibilités d'interaction avec les ions sont donc accrues. Malgré cela, il nous a été possible d'étudier quantitativement l'action de plusieurs cations alcalins et alcalino-terreux sur l'hydrolyse trypsique de quelques protéines. Nous avons cherché à définir comment la fixation de cations par le substrat modifie son affinité pour l'enzyme, ainsi que les constantes thermodynamiques qui caractérisent les différents processus de la réaction.

CHAPITRE I^{er}

PRÉPARATIONS ET TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

A. PRÉPARATION DES PROTÉINES UTILISÉES.

Nous avons choisi un certain nombre de protéines cristallines susceptibles d'être digérées par la trypsine, soit à l'état natif, soit à l'état dénaturé : lactoglobuline, sérumalbumine, hémoglobine, caséine. Mais l'étude la plus importante a été effectuée avec la lactoglobuline.

1. Lactoglobuline.

Cette protéine peut être purifiée et cristallisée par deux méthodes différentes : celle de SØRENSEN et SØRENSEN⁽⁸¹⁾ et celle de PALMER⁽⁵⁾. La comparaison des propriétés de la lactoglobuline obtenue par ces deux méthodes n'a montré aucune différence essentielle^(20, 48). Nous préparons cette protéine au

laboratoire selon la méthode de PALMER, modifiée par OGSTON⁽⁴⁾ : on précipite les protéines du petit lait de vache par des concentrations appropriées de sulfate d'ammonium en ajustant, aux différentes étapes de la préparation, le pH du milieu par des dialyses successives : on obtient finalement de beaux cristaux de lactoglobuline. A l'heure actuelle, nous utilisons une méthode encore plus simple qui consiste à précipiter directement la lactoglobuline, en amenant à 75 % de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ le filtrat obtenu après filtration de la caséine⁽¹⁷⁾. Les cristaux sont décantés, séchés sur BÜCHNER, puis redissous dans ClNa 0,5 M, et par dialyse contre l'eau bidistillée, on obtient une première recristallisation. Généralement, on effectue deux fois cette opération. Toutefois, si un peu de pigment brun est entraîné au cours de la préparation, on dissout les cristaux dans le tampon acétate pH 5,2 au lieu de ClNa 0,5 M

et l'on centrifuge ; dans ces conditions, le pigment brun est insoluble.

Après la deuxième recrystallisation, les cristaux de lactoglobuline sont conservés à la glacière en suspension dans leur eau-mère. Pour chaque expérience, on en prélève une certaine quantité, et après centrifugation, on les dissout dans le tampon approprié. On rapproche cette solution du pH désiré en dialysant contre le tampon ; puis le pH est encore vérifié et ajusté à 0,02 pH près. La concentration de la lactoglobuline est obtenue par mesure de la densité optique à 280 m μ (le coefficient d'extinction à cette longueur d'onde est $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ mg/cm}^3} = 0,93$ [79 20]).

— Nous avons adopté un poids moléculaire de 35.000.

Bien que la lactoglobuline présente aux environs du point isoélectrique deux composants en proportions variables (59, 39, 3), cette protéine, utilisée vers pH 7 ou 8, semble suffisamment homogène pour servir de substrat à la trypsine. En effet, quel que soit l'échantillon de lactoglobuline employé, et quel que soit le mode de conservation (cristaux lyophilisés ou cristaux conservés en suspension dans l'eau vers 2°), la reproductibilité des mesures est satisfaisante.

2. Sérumbalbumine.

Le produit utilisé est la sérumbalbumine ARMOUR (fraction V) préparée selon la méthode de COHN (21).

3. Hémoglobine.

L'hémoglobine employée pour nos expériences nous a été donnée par M^{me} GUASTALLA que nous remercions très vivement. La concentration de cette protéine est mesurée par lecture de la densité optique à 5.765 Å. A cette longueur d'onde, une densité $D = 15,2$ correspond à un milliéquivalent de fer par litre, soit 17 g de protéine, si l'on prend comme poids moléculaire 68.000 (·).

L'hémoglobine, qui doit être préalablement dénaturée pour subir l'attaque tryptique, a été traitée par l'urée suivant la technique d'ANSON (1, 2).

4. Caséine.

La caséine soluble « ALLEN et HANBURY » a principalement servi à mesurer l'activité absolue de la trypsine suivant la méthode de KUNITZ (3). De plus, nous l'avons utilisée pour comparer l'action des ions

sur différentes protéines. Les solutions sont préparées selon le procédé de KUNITZ (73). Un gramme de caséine est suspendu dans 100 centimètres cubes de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,6, puis on chauffe 15 minutes dans l'eau bouillante. On filtre la solution et on la garde à la glacière avec un peu de toluène. La caséine ainsi préparée ne se conserve que trois ou quatre jours.

5. Trypsine.

Nous avons utilisé la trypsine cristalline « WORTHINGTON » qui contient 50 % de sulfate de magnésium. Elle est dissoute dans HCl M/100, puis dialysée exhaustivement contre ce même solvant afin d'éliminer le sel ; elle est conservée à la glacière et peut être utilisée sans perte sensible d'activité pendant huit à quinze jours. Sa concentration est mesurée par la valeur de la densité optique à 280 m μ ($E_{1\text{ cm}}^{1\text{ mg/cm}^3} = 1,37$ (85, 86) ; $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ mg/cm}^3} = 1,88$ (54) ; c'est la première valeur que nous avons adoptée.

B. TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES.

Pour suivre la marche de la protéolyse, nous avons principalement utilisé deux procédés de dosages : une méthode titrimétrique qui permet le titrage des groupes basiques apparus au cours de la protéolyse, et une méthode spectrophotométrique après précipitation trichloracétique des protéines qui permet de suivre l'apparition d'acides aminés et de polypeptides.

1. Méthode titrimétrique de Linderström-Lang (60).

La dissociation des différents groupes d'un amino-acide ou d'une protéine change considérablement avec la constante diélectrique du milieu et un certain nombre de groupes dont le titrage est impossible dans l'eau deviennent facilement titrables dans des milieux de constante diélectrique plus faible (acétone ou alcool).

Considérons, en effet, le cas du titrage d'un groupe COO⁻ par HCl. Pour avoir une bonne précision dans le dosage, il doit rester, en fin de titrage, moins de 1 % des groupes titrables sous la forme COO⁻. Or, la plupart des amino-acides en solution aqueuse ont un pK de dissociation trop faible pour que ces conditions puissent être réalisées. Mais si l'on diminue la constante diélectrique du milieu, les forces d'attraction entre les charges de signes contraires COO⁻ et H⁺ augmentent, par conséquent

la dissociation diminue et le pK apparent devient plus élevé. Les conditions pour le titrage pourront donc se trouver réalisées.

Considérons maintenant les groupes aminés et les groupes carboxyles libres d'une protéine. Vers pH 7 ou 8, les groupes carboxyles sont tous sous la forme COO^- , et les groupes aminés se trouvant dans une région de pH inférieure à leur pK de dissociation (à condition toutefois qu'ils ne soient pas trop faiblement basiques) sont sous la forme NH_3^+ . Lors du titrage par un acide, on titre donc les groupes carboxyles.

La méthode de LINDERSTRÖM-LANG consiste à titrer par HCl M/10 en solution alcoolique les groupes carboxyles apparus par suite de la rupture de liaisons peptidiques. L'indicateur utilisé est le rouge naphthyl (benzène-azo-naphtylamine) (*). Cet indicateur a une zone de virage très étroite : dans l'eau et dans l'acétone, il vire entre pH 3,7 et pH 5. On l'utilise en solution acétonique. Les amino-acides étant solubles dans l'acétone sous forme de chlorures, on doit ajouter une certaine quantité d'HCl en solution alcoolique avant l'addition d'acétone. Par ailleurs, la protéolyse est effectuée vers pH 7 ou 8 et le dosage se fait entre pH 5 et 3,7. On titre un certain nombre de groupes sur la protéine non hydrolysée pour l'amener au pH de virage ; on appelle « valeur initiale de titrage » la quantité d'acide nécessaire à ce titrage. Cette quantité d'acide, ajoutée avant l'acétone, suffit à empêcher la précipitation.

Nous avons décrit le détail expérimental dans une publication antérieure ⁽⁵⁶⁾.

Lors du titrage des solutions témoins (qui correspondent au temps zéro de la protéolyse), on ajoute l'acide en solution alcoolique correspondant à la valeur initiale de titrage avant d'ajouter la trypsine, et ceci afin d'empêcher l'hydrolyse. Pour chaque série d'expériences, on fait trois témoins de coloration de plus en plus intense et l'on fait tous les dosages en amenant la couleur à égalité avec chacun des trois témoins. La coloration reste stable pendant au moins une heure ⁽⁶²⁾. Certains auteurs déterminent spectrophotométriquement le changement de couleur ⁽⁹³⁾.

Le nombre de liaisons peptidiques détruites en fonction du temps correspond à un facteur près à la différence entre le dosage au temps t et le témoin.

La valeur initiale de titrage (que nous appelons V I) varie linéairement avec la concentration c de la protéine en solution, ce qui permet d'obtenir le

nombre de groupes titrés par mole de protéine à un pH déterminé ; il est de 42 ± 2 pour la lactoglobuline en tampon borate pH 7, si nous admettons un poids moléculaire de 35.000. Nous verrons par la suite que le nombre de groupes titrés sur une protéine peut changer notablement si l'on ajoute des sels.

Cette méthode de dosage permet une bonne précision dans la mesure de la protéolyse. D'autre part, elle ne présente pas les inconvénients des méthodes de titrage aux pH alcalins, tels le titrage de WILLSTÄTTER et WALDSCHMIDT-LEITZ ⁽⁸⁸⁾ ; dans ces techniques, une erreur systématique peut intervenir par suite de l'absorption du CO_2 atmosphérique par les solutions alcalines (pH de titrage : 12). Bien que cette erreur puisse être réduite si l'on fait le dosage en atmosphère d'azote ⁽⁷⁸⁾, un autre inconvénient subsiste : il peut se produire une dénaturation superficielle de l'enzyme suivie d'une précipitation, ce qui conduit à une diminution progressive de la couleur de l'indicateur (thymolphthaleïne) interférant ainsi dans le dosage ⁽⁷⁰⁾. La méthode de titrage en milieu acide, pH 4, ne présente aucun de ces inconvénients.

Toutes les solutions de protéines utilisées en tampon borate pH 7, peuvent être titrées de cette manière sans aucune difficulté.

Toutefois, un inconvénient peut venir limiter son application. Pour amener les solutions de pH 7 ou 8 à pH 4, la quantité d'acide nécessaire peut être considérable. Ceci se produit par exemple pour les solutions de lactoglobuline en tampon phosphate ; dans ce cas, par suite d'une valeur initiale de titrage trop forte, nous avons dû renoncer à cette technique et en adopter une plus adéquate. Nous avons utilisé la méthode spectrophotométrique après précipitation trichloracétique chaque fois que la méthode précédente ne pouvait convenir.

2. Méthode spectrophotométrique après précipitation trichloracétique.

La plupart des protéines sont précipitées par l'acide trichloracétique en solution aqueuse, alors que les acides aminés et certains polypeptides restent en solution. La détermination de la densité optique à 280 m μ dans le surnageant après centrifugation permet donc de suivre l'intensité de la protéolyse.

Nous utilisons cette méthode pour évaluer l'hydrolyse de la caséine lorsque nous mesurons l'activité absolue de la trypsine. A 2 centimètres cubes du mélange caséine-trypsine, on ajoute 3 centimètres cubes d'acide trichloracétique 5 %, qui arrête la protéolyse en même temps qu'elle précipite la fraction protéique non digérée. On laisse le précipité flocculer

(*) Nous tenons à remercier M. L'ARROD qui a bien voulu préparer pour nous l'indicateur.

pendant une heure à la température de la pièce, puis on centrifuge et l'on mesure la densité optique du surnageant à 280 m μ . Cette méthode donne des résultats quantitatifs avec la plupart des protéines, mais avec la lactoglobuline elle ne s'est pas révélée satisfaisante.

Dans ce dernier cas, on pouvait penser utiliser un mélange acétone-acide trichloracétique susceptible de précipiter totalement la protéine ⁽⁴⁷⁾; mais par suite de l'absorption de l'acétone dans l'ultraviolet, la mesure spectrophotométrique devient impossible. Nous avons pu obtenir des résultats satisfaisants en utilisant le mélange suivant :

- acide trichloracétique : 5 % ;
- alcool éthylique : 30 % ;
- eau 65 % ;

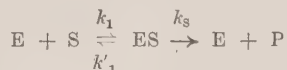
qui n'absorbe que faiblement dans l'ultraviolet. Nous avons comparé cette méthode avec la méthode classique en suivant l'hydrolyse de la caséine dans des conditions exactement identiques. On obtient les mêmes résultats par les deux méthodes. Et, comme nous le verrons plus loin, on retrouve la même constante de MICHAELIS pour le système lactoglobuline-trypsine à pH 7, par cette méthode et par la méthode de LINDERSTRÖM-LANG.

CHAPITRE II

CINÉTIQUE DES RÉACTIONS DE PROTÉOLYSE

A. RÉACTIONS ENZYMATIQUES EN ABSENCE D'INHIBITEURS : THÉORIE DE HENRI-MICHAELIS.

D'après la loi quantitative de la cinétique enzymatique formulée par V. HENRI ⁽⁴³⁾, une réaction enzymatique comporte deux processus essentiels : la formation réversible d'un complexe entre l'enzyme et le substrat, et la dissociation irréversible de ce complexe pour donner naissance aux produits de la réaction suivant le schéma :



E étant l'enzyme, S le substrat, ES le complexe intermédiaire et P les produits de réaction, k_1 , k'_1 et k_s les constantes spécifiques.

Cette théorie fut reprise plus tard par MICHAELIS et MENTEN ⁽⁶⁶⁾, puis généralisée par HALDANE ^(11, 41).

On obtient une équation des vitesses de la forme :

$$v = \frac{k_s e s}{K_m + s}$$

dans laquelle e , s représentent respectivement les concentrations totales de l'enzyme et du substrat ; K_m est la constante de MICHAELIS du système, elle est égale à $(k'_1 + k_s)/k_1$.

On obtient une réaction d'ordre zéro si K_m est très petit devant s et une réaction d'ordre 1 si K_m est très grand ^(28, 49).

Cette expression de la vitesse suppose que la concentration de l'enzyme est négligeable devant celle du substrat ($e \ll s$). C'est ce qui se passe, en effet, dans la plupart des réactions enzymatiques prises

dans les conditions optima. STRAUS et GOLDSTEIN ^(84, 32) ont différencié les équations dans le cas où cette condition n'est pas réalisée.

Détermination des constantes.

Une réaction enzymatique est pratiquement définie, si l'on peut connaître d'une part la constante de MICHAELIS K_m qui, lorsque k_s est négligeable devant k'_1 , représente la constante de dissociation du complexe (soit donc l'inverse de la constante d'affinité), d'autre part la constante de vitesse k_s . Cette dernière valeur se calcule à partir de la vitesse maximum V_m . En effet, on atteint la vitesse maximum lorsque tout l'enzyme est sous forme de complexe ES. Ce qui s'exprime en écrivant :

$$V_m = k_s e$$

L'équation des vitesses peut alors se mettre sous la forme :

$$v = \frac{V_m s}{K_m + s}$$

De préférence à celui de MICHAELIS ⁽⁶⁶⁾, deux procédés sont actuellement utilisés pour la détermination des constantes : d'une part celui de LINEWEAVER ⁽⁶⁴⁾, d'autre part celui de G. S. EADIE ^(25, 26). Dans ce dernier, qui a été adopté ici, l'équation des vitesses est mise sous la forme :

$$v = V_m - K_m v/s$$

Si l'on porte v en fonction de v/s , on obtient une droite de pente $-K_m$, et dont l'intersection avec l'axe des ordonnées donne V_m .

B. RÉACTIONS ENZYMATIQUES EN PRÉSENCE D'UN INHIBITEUR.

Lorsqu'un inhibiteur intervient dans une réaction enzymatique, plusieurs possibilités peuvent se présenter. Il peut exercer une action soit sur l'enzyme, soit sur le substrat.

1. Fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme.

Les différents types d'inhibition (compétitif, non compétitif, blocage du complexe intermédiaire) susceptibles de modifier le cours de la réaction ont été étudiés principalement par LINEWEAVER et BURK⁽⁶⁴⁾, puis par EBERSOLE, GUTTENTAG et WILSON^(27, 89).

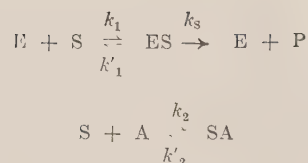
Lorsque l'inhibition peut être assimilée à l'un de ces types simples, l'étude des variations des constantes V'_m et K'_m , en fonction de la concentration de l'inhibiteur permet de distinguer la forme d'inhibition impliquée dans la réaction. La méthode la plus directe consiste à utiliser la représentation d'EADIE^(25, 26, 46), la pente de la droite ainsi obtenue donnant directement la constante de MICHAELIS expérimentale ($-K'_m$) et l'intersection avec l'axe des ordonnées donnant la vitesse maximum (V'_m); K_m et V_m représentent ces valeurs respectives en absence d'inhibiteur. Le tableau I résume les différentes possibilités (voir p. 12).

Par conséquent, il est relativement facile de déterminer le mode d'action d'un inhibiteur, à moins qu'un phénomène plus complexe n'intervienne dans la protéolyse.

2. Fixation de l'inhibiteur sur le substrat.

Les formules précédentes exprimant les différents types d'inhibition supposent qu'il n'y a qu'un groupe sensible sur la molécule d'enzyme. Elles s'appliquent encore s'il y a plusieurs groupes sensibles⁽⁶³⁾ à condition que les différents complexes continuent de se former molécule à molécule, ou bien si les groupes sont indépendants [dans ce cas, on doit discuter la signification des constantes⁽⁸⁷⁾]. Nous avons cherché à établir des formules équivalentes lorsque l'inhibiteur se fixe non plus sur l'enzyme, mais sur le substrat.

a) *Inhibition compétitive.* — Nous exprimons maintenant qu'il y a compétition entre l'enzyme et l'inhibiteur. Nous appelons A l'inhibiteur lorsqu'il se fixe sur le substrat. Nous aurons le schéma suivant :

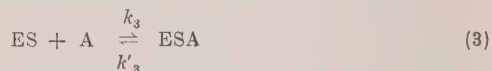
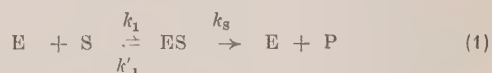


(A) est la concentration de l'inhibiteur libre (qui est pratiquement égale à celle de l'inhibiteur total, celui-ci étant presque toujours en excès). Nous discuterons plus loin cette simplification. Nous appelons K_1 la constante d'inhibition telle que $K_1 = k'_2/k_2$. On aboutit à une équation des vitesses de la forme :

$$v = \frac{k_3 e s}{K_m \left[1 + \frac{(A)}{K_1} \right] + s} \quad (1)$$

Quand l'inhibition est compétitive, nous retrouvons une formule absolument semblable, que l'inhibiteur se fixe sur l'enzyme ou sur le substrat ; ce que l'on pouvait prévoir puisqu'il se fixe au point d'union de ces deux molécules.

b) *Inhibition non compétitive.* — On peut l'exprimer par le schéma suivant :



dans lequel $K_1 = k'_2/k_2 = k'_3/k_3$; on suppose que l'inhibiteur présente la même affinité pour le substrat seul que pour le complexe intermédiaire.

L'équation des vitesses devient :

$$v = \frac{k_3 e s}{K_m + s} \cdot \frac{1}{1 + \frac{(A)}{K_1}} \quad (2)$$

De même que dans le cas de l'inhibition compétitive, nous retrouvons la même équation des vitesses que l'inhibiteur soit fixé sur l'enzyme ou sur le substrat. Par conséquent, si l'on peut établir préalablement sur laquelle de ces deux molécules se fixe l'inhibiteur, l'utilisation des formules permettra de déterminer la nature de l'inhibition dans l'un et l'autre cas, et la variation des constantes expé-

mentales en fonction de la concentration de l'inhibiteur permettra de connaître le type d'inhibition impliqué dans la réaction (tableau I).

Indépendamment, nous sommes arrivés aux mêmes conclusions que FRIENDENWALD et MAENGWIN-DAVIES ⁽³⁰⁾.

téolyse des quantités importantes de produits de réaction (de l'ordre de la concentration du substrat), obtenus en ultrafiltrant l'hydrolysate de lactoglobuline à travers une membrane « Membranfilter Göttingen » de porosité « feinst », nous n'observons aucune inhibition. La lactoglobuline est utilisée

TABLEAU I

Forme d'inhibition	Pente K'_m	Intersection V'_m
Compétitive	$K'_m = K_m \left[1 + \frac{(I)}{K_i} \right]$	$V'_m = V_m$
Non compétitive	$K'_m = K_m$	$V'_m = V_m \left[1 + \frac{(I)}{K_i} \right]$
« Uncompétitive » ou blocage du complexe intermédiaire.	$K'_m = K_m \left[1 + \frac{(I)}{K_i} \right]$	$V'_m = V_m \left[1 + \frac{(I)}{K_i} \right]$

Il y a toutefois une différence dans les limites d'application de ces formules suivant que l'inhibiteur se fixe sur l'enzyme ou sur le substrat. En effet, nous avons admis, au cours de nos calculs, que l'inhibiteur se trouve toujours en excès, de sorte que la concentration de l'inhibiteur libre est assimilée à celle de l'inhibiteur total, ce qui est parfaitement légitime tant que la concentration de l'enzyme ou du substrat est très petite devant celle de l'inhibiteur. Or, la concentration du substrat étant généralement supérieure à celle de l'enzyme, la limite d'application des formules sera plus étroite dans le cas de la fixation de l'inhibiteur par le substrat. Au-delà de ces limites, on doit utiliser les équations établies par STRAUS et GOLDSTEIN ^(32, 34).

C. CINÉTIQUE DE PROTÉOLYSE DE LA LACTOGLOBULINE PAR LA TRYPSINE.

Un certain nombre de protéines cristallines sont susceptibles d'être hydrolysées par la trypsine, soit à l'état natif, soit après dénaturation. Nous avons étudié la cinétique de protéolyse de quelques protéines et particulièrement de la lactoglobuline. Nous indiquons tout d'abord les résultats obtenus en tampon borate ⁽⁵⁶⁾ ou en tampon phosphate sans addition d'autres ions que ceux du tampon, afin de les comparer à ceux que l'on obtient lorsqu'un cation différent intervient dans la protéolyse.

Nous donnerons simplement la constante de MICHAELIS expérimentale ainsi que la constante de vitesse k_s sans faire aucune hypothèse quant aux mécanismes plus complexes que peut impliquer une telle réaction. Toutefois, l'hypothèse d'une inhibition par les produits de la réaction peut être éliminée. En effet, lorsque l'on ajoute dès le début de la pro-

teolyse des quantités importantes de produits de réaction (de l'ordre de la concentration du substrat), obtenus en ultrafiltrant l'hydrolysate de lactoglobuline à travers une membrane « Membranfilter Göttingen » de porosité « feinst », nous n'observons aucune inhibition. La lactoglobuline est utilisée

sous sa forme native ; nous n'aurons pas à tenir compte dans ce travail du fait qu'elle subit peut-être avant l'attaque enzymatique une dénaturation catalysée ou non par la trypsine, comme le veut l'hypothèse de LINDERSTRÖM-LANG ⁽⁶¹⁾. L'activité protéinase de la trypsine s'exerce au voisinage des groupes arginine et lysine de la protéine ^(4, 5, 6, 44, 45). D'autre part, on trouve 35 liaisons peptidiques détruites par molécule de lactoglobuline après hydrolyse tryptique complète ⁽⁶⁷⁾. Or, on peut être frappé par le fait que la lactoglobuline contient 29 lysines et 6 arginines d'après CANNAN, PALMER et KIBRICK ⁽¹⁴⁾ en admettant un poids moléculaire de 40.000 [d'autres auteurs trouvent un chiffre un peu plus élevé ^(9, 10)], soit environ 35 points d'attaque possibles pour la trypsine. Il existe donc un accord excellent entre les résultats expérimentaux et les conditions qu'exigent la spécificité de la trypsine. C'est cette valeur $N = 35$ que nous avons utilisée pour établir la correspondance entre le nombre de liaisons peptidiques détruites que l'on obtient directement par le titrage et le nombre de molécules de lactoglobuline hydrolysées.

L'allure de la cinétique à pH 7 pour plusieurs concentrations de substrat et la détermination des constantes K_m et V_m d'après la représentation d'EADIE ont été données dans une publication antérieure [voir fig. 2 ⁽⁵⁶⁾]. D'après plusieurs expériences, la constante de MICHAELIS de ce système a une valeur moyenne de $1,8 \cdot 10^{-4}$ M à pH 7,1 et à 35° C et k_s est égal à $1,9 \cdot 10^{-5}$ liaisons peptidiques détruites par minute, par centimètre cube et par milligramme d'azote de l'enzyme dans les mêmes conditions. Dans la suite de ce travail, v_0 , la vitesse initiale de protéolyse, sera toujours exprimée en liaisons peptidiques détruites par minute et par centimètre cube lorsque la protéolyse est mesurée par la méthode

titrimétrique ; si l'on utilise la méthode spectrophotométrique, v_o sera exprimé en valeur relative par la densité optique à 280 m μ par minute (D_{280} par min.) ; on peut aussi exprimer v_o en valeur absolue en prenant comme coefficient d'extinction des produits d'hydrolyse de la lactoglobuline dans l'acide trichloracétique $\varepsilon = 1,0$ ⁽⁵⁵⁾.

La valeur de K_m ne varie pratiquement pas avec la température ⁽⁵⁶⁾. La comparaison des constantes de MICHAELIS obtenues pour le même enzyme agissant sur divers substrats montre des différences importantes suivant la nature des substrats (dipeptides de synthèse, esters, protéines, etc.) :

Benzoyl-L-arginine méthyl ester .	0,8 10^{-4} M	(79)
Benzoyl-L-argininamide	21 10^{-4} M à 25°	(42)
Benzoyl-L-tyrosinamide	424 10^{-4} M	} (49)
Benzoyl-L-tyrosine éthyl ester ...	39 10^{-4} M	
Sturine	7,5 10^{-3} M	} (11. 12)
Chymotrypsinogène	1,3 10^{-3} M	
Lactoglobuline	1,8 10^{-4} M	

Dans la mesure où ces diverses réactions suivent la loi de HENRI-MICHAELIS, les valeurs de $1/K_m$ donnent une idée de l'affinité de l'enzyme pour ces divers composés. La trypsine semble donc avoir une grande affinité pour la lactoglobuline.

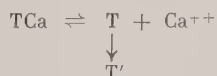
CHAPITRE III

ACTION DU CALCIUM

Depuis longtemps déjà, on avait observé que le calcium pouvait agir sur la trypsine ⁽²²⁾. En 1941, grâce au travail de MAC DONALD et KUNITZ ⁽²³⁾, avec des produits purs et cristallisés, on a pu connaître quantitativement l'action du calcium sur la formation de la trypsine et de la protéine inactive à partir du trypsinogène. Mais l'action du calcium sur la trypsine ne se réduit pas à une augmentation de la vitesse de formation de cet enzyme à partir de son zymogène.

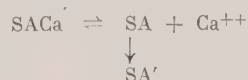
On sait que la trypsine existe sous une forme active en équilibre avec une forme inactive ; celle-ci résulterait d'une dénaturation de l'enzyme et serait digérée par la première : l'inactivation est rapide aux pH supérieurs à 6 ^(53, 54, 72, 73). A l'heure actuelle, de nombreux travaux ont démontré le rôle protecteur du calcium contre l'inactivation de la trypsine aux pH alcalins.

GORINI ⁽³³⁾ montre que le calcium augmente la stabilité de la trypsine et d'une protéine pouvant servir de substrat à cet enzyme. Il admet que Ca^{++} agit sur la trypsine (T) pour former réversiblement un complexe (TCa) empêchant ainsi la dénaturation de l'enzyme, et par suite son inactivation ; T' représente la forme dénaturée :



D'autre part, le calcium serait susceptible de se fixer d'une manière analogue sur la sérumalbumine (SA), laquelle serait ainsi protégée contre l'attaque

enzymatique ; toutefois, l'auteur est amené à admettre que la dénaturation est le premier stade de la digestion d'une protéine et qu'elle est irréversible, le calcium empêcherait cette dénaturation. Dans les deux cas, on aurait donc un équilibre réversible entre le calcium et la protéine :



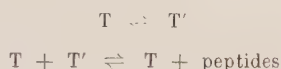
SACa représente le complexe sérumalbumine-calcium, SA' la protéine dénaturée.

Il résulte de ces travaux que la seule forme active de l'enzyme serait le complexe calcium-trypsine. La même année, BIER et NORD ⁽⁷⁾ trouvent que le calcium et le manganèse assurent la stabilité de l'enzyme aux pH alcalins.

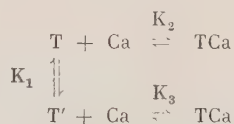
On savait que l'enzyme, à pH 8 et à 30°, ne conserve plus que 5 % de son activité au bout de 24 heures ^(73, 54) : cette inactivation n'a plus lieu en présence de calcium. Poussant plus loin leur investigation, BIER et NORD ^(8, 24, 71) ont montré que l'adjonction de calcium modifie la structure de la trypsine. L'étude électrophorétique et la sédimentation ont mis en évidence le fait que la trypsine, en présence de calcium, se scinde en deux composants alors qu'en l'absence de ce cation, elle se présente comme une protéine parfaitement homogène. BIER et NORD ont conclu à l'existence d'un équilibre entre des formes dimère et monomère (la forme monomère étant favorisée par la présence de calcium).

GREEN et NEURATH (^{37, 38, 69}) montrent que la trypsine dialysée ne possédant plus que des traces de calcium est encore active ; l'addition de calcium n'augmente l'activité estérase et amidase de la trypsine que de vingt pour cent et n'a pas d'action sur l'activité protéinase (les substrats utilisés étaient la salmine et le chymotrypsinogène).

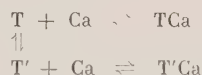
Les auteurs admettent que ce cation agit seulement en protégeant l'enzyme contre son autodigestion. Pour expliquer leurs résultats, ils proposent une modification de la théorie de GORINI. La perte de l'activité de la trypsine au-dessus de pH 5 provenant essentiellement de son autodigestion, on peut écrire que la trypsine active (T) attaque la trypsine inactive suivant le schéma proposé déjà par NORTHROP (⁷³) :



En présence de calcium dans le milieu, on a une modification de l'équilibre :



K_1 , K_2 et K_3 représentent les constantes d'équilibre. Les auteurs admettent d'une part que la trypsine active T possède la même activité que le complexe TCa et d'autre part que $K_2 = K_3$. Or, ce schéma n'est possible que si $K_1 K_3 = K_2$, ou si l'on a :



En se combinant avec la trypsine, le calcium la protège contre son autodigestion aux pH alcalins. La même année, GORINI et FÉLIX (³⁶) arrivaient aux mêmes conclusions.

Il résulte de l'ensemble de ces travaux, et plus particulièrement de ceux de GORINI (^{33, 34, 35}) que l'on peut envisager la possibilité d'action du calcium à la fois sur l'enzyme et sur son substrat. Dès lors, il nous semblait intéressant d'effectuer une étude quantitative systématique de l'action du calcium sur une cinétique de protéolyse pour laquelle on utilise un enzyme et une protéine cristallisés.

A. ASPECT QUALITATIF.

La technique expérimentale que nous avons utilisée est une modification de celle de LINDERSTRÖM-LANG (⁶¹) décrite en I,

On ajoute le calcium à la solution de lactoglobuline en tampon borate, en ayant soin de ramener le pH à sa valeur initiale mesurée avant l'addition de chlorure de calcium (ce dernier acidifiant légèrement la solution, même lorsqu'on l'ajoute en solution tamponnée). Pour avoir des résultats reproductibles, nous laissons la lactoglobuline en présence de calcium environ trois heures avant le début de la protéolyse. La plupart de nos expériences sont faites à pH 7,1 et à 35°.

Dans une expérience préliminaire, nous avons pu observer une diminution notable de la vitesse d'apparition des produits de digestion sous l'influence du calcium, comme le montre le tableau ci-dessous :

Sol. n°	s_0 mg/cm ³	Ca ⁺⁺ M/l	v_0 (liaisons pept./min./cm ³)
1	9,7	0,0091	1,9 10 ⁻⁷
2	9,7	0	3,3 10 ⁻⁷
3	3,2	0,0091	0,75 10 ⁻⁷
4	3,2	0	1,5 10 ⁻⁷

s_0 représente la concentration initiale du substrat exprimée en mg/cm³, v_0 la vitesse initiale de protéolyse exprimée en liaisons peptidiques détruites par minute et par centimètre cube de solution.

1. Action lente sur le substrat.

Ces résultats étant incompatibles avec l'action du calcium sur l'enzyme généralement admise par les auteurs, on pouvait supposer une action de protection du substrat semblable à celle trouvée par GORINI sur la sérualbumine (³³), ou encore la résultante de deux actions inverses sur le substrat et sur l'enzyme, l'action sur le substrat étant prépondérante.

Afin de discerner le mécanisme de l'action du calcium sur un système aussi complexe, nous avons fait l'expérience suivante nécessitant une légère modification de notre technique expérimentale habituelle.

Dans trois tubes munis chacun de deux diverticules, nous versons 10 centimètres cubes (mesurés avec une grande précision) d'une même solution de lactoglobuline. Dans l'un des diverticules du premier tube, nous introduisons successivement 0,313 centimètres cubes (mesurés à l'aide d'une micropipette à striction) d'une solution de trypsine, puis la même quantité d'une solution de chlorure de calcium 0,1 M. Nous laissons la trypsine en présence de

calcium pendant trois heures. Dans le deuxième tube, nous opérons différemment. La même quantité de trypsine est versée dans le premier diverticule, mais cette fois nous mettons le calcium dans l'autre diverticule afin qu'il ne soit pas en contact avec l'enzyme avant le temps zéro marquant le début de la protéolyse. Dans le troisième tube, la solution de chlorure de calcium est remplacée par de l'eau bidistillée pour conserver la même concentration finale d'enzyme et de substrat. Donc les trois tubes contiennent finalement au temps zéro de la protéolyse une même quantité d'enzyme et de substrat à la même concentration. Seuls diffèrent la présence de calcium et sa durée d'action sur la trypsine avant le début de la protéolyse. Tous les mélanges sont faits au temps zéro ; des prélèvements sont effectués à des temps divers et les groupes COO^- libérés sont titrés par la méthode de LINDERSTRÖM-LANG.

Il résulte de l'allure des courbes obtenues (fig. 1)

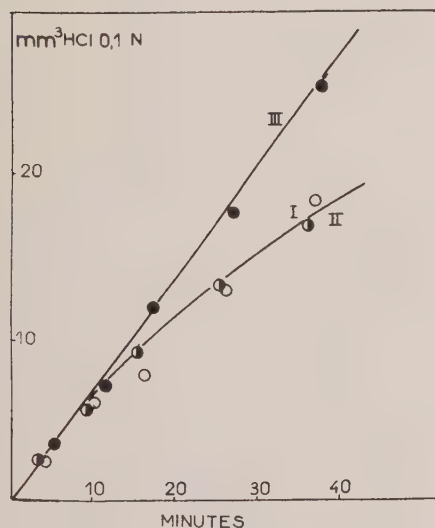


Fig. 1. — Mise en évidence d'une action lente du calcium s'exerçant sur le substrat. — Courbe I (○) : le calcium est ajouté au temps zéro de la réaction. Courbe II (◐) : la trypsine est restée trois heures en présence de calcium avant le début de la protéolyse. Courbe III (●) : la protéolyse est effectuée en absence de calcium.

que si le calcium a une action sur la trypsine, cette action est immédiate puisque les courbes I et II sont superposables. Or, le calcium exerce une action inhibitrice qui n'est pas immédiate, puisque les courbes I et II ne s'écartent de la courbe III qu'au bout de 9 à 10 minutes. Donc, l'action inhibitrice du calcium s'exerce sur le substrat.

Aucune action sur l'enzyme n'a pu être décelée. La trypsine utilisée étant conservée à un pH acide, dans ces conditions l'inactivation de l'enzyme est trop lente pour que l'action protectrice du calcium soit visible en trois heures, toutefois ce résultat conduit à admettre qu'il n'y a pas d'activation de l'enzyme sous l'influence du calcium, ce que GREEN et NEURATH⁽³⁸⁾ avaient déjà mentionné ; la seule influence possible est une protection aux pH alcalins.

2. Influence du pH.

Des expériences faites à pH 8 et pH 7 nous ont montré que dans cette zone, le pH n'a aucune influence sur l'action inhibitrice du calcium.

Ca ⁺⁺ M/l	v ₀ pH 7 (L.P.* /min./cm ³) e = 154 γ/cm ³	v ₀ pH 8 (L.P.* /min./cm ³) e = 84 γ/cm ³	Rapport v ₀ (Ca ⁺⁺) v ₀	
			pH 7	pH 8
0	1,1.10 ⁻⁷	2,8.10 ⁻⁷		
0,457	0,45.10 ⁻⁷	1,14.10 ⁻⁷	0,410	0,406

(*) L.P. = liaisons peptidiques hydrolysées.

La concentration de lactoglobuline dans ces expériences est 3,2 mg/cm³.

B. ETUDE DE L'ÉQUILIBRE LACTOGLOBULINE-CALCIUM.

1. Influence de la concentration de calcium sur la vitesse de protéolyse. (Détermination de la constante K_{Ca}).

Lorsque l'on fait varier la concentration de l'ion calcium, les concentrations respectives de l'enzyme et du substrat restant constantes, on observe une diminution de la vitesse de protéolyse d'autant plus importante que la concentration de calcium est plus élevée ; cette diminution de la vitesse n'est visible qu'à partir de concentrations de calcium de l'ordre de 9.10^{-4} M , au-delà de 0,04 M, la vitesse d'hydrolyse ne diminue plus.

Pour connaître avec précision la vitesse initiale, les courbes de protéolyse n'étant pas obligatoirement linéaires, même pendant les dix premières minutes, nous avons suivi la protéolyse de manière à déterminer soigneusement le début de la courbe ; les

prélèvements sont faits à intervalles suffisamment rapprochés (environ 2 à 3 minutes suivant les expériences) et nous faisons de quatre à six points par courbe. Ceci est très important pour établir une comparaison lors d'un changement de l'activité de cet enzyme. Certains auteurs se contentent de mesurer l'attaque enzymatique au bout de dix minutes et même parfois au bout de trente minutes ; ceci implique une proportionnalité dans l'apparition des produits de digestion en fonction du temps, au moins pendant l'intervalle considéré. Même si cette proportionnalité est démontrée dans les conditions normales, elle peut disparaître sous l'influence d'un agent quelconque et l'on introduirait ainsi des erreurs dans l'interprétation des résultats.

La figure 2 montre nettement la diminution de la vitesse initiale de protéolyse à mesure qu'augmente la concentration de Cl_2Ca , jusqu'à une limite indiquée par la courbe inférieure.

D'autre part, la variation de v_0 en fonction du logarithme de l'inverse de la concentration de calcium est représentée par une courbe « dose-effet » classique (voir fig. 3). Le tableau II résume les diverses expériences que nous avons faites pour des concentrations de substrat variant assez largement de part et d'autre de K_m .

On peut admettre que la diminution de la vitesse de protéolyse est due à la formation d'un complexe réversible entre le calcium et le substrat (par dialyse contre l'eau bidistillée, le calcium se sépare de la protéine). Si l'on appelle K_{Ca} la constante de dissociation des combinaisons entre certains groupes de la lactoglobuline et du calcium, la courbe $v_0 = f(\log. 1/[\text{Ca}^{++}])$, nous permet d'obtenir K_{Ca} à partir de la concentration de Ca correspondant à la demi-saturation du substrat en calcium. En fait, cette constante K_{Ca} indique la demi-saturation en calcium des groupes du substrat qui interviennent dans la protéolyse. Elle correspond à une constante d'inhibition d'un type un peu particulier puisque l'inhibiteur se fixe sur le substrat. Si le calcium se fixe en d'autres points de la molécule de lactoglobuline, il ne sera nullement décelé par cette méthode. Nous discuterons plus loin la signification exacte de K_{Ca} .

Afin d'avoir une sécurité plus grande, nous avons fait la détermination de K_C pour trois concentrations de substrat (ces expériences correspondant aux trois séries a, b, c). Nous donnons les valeurs trouvées pour K_{Ca} .

	(a)	(b)	(c)
s_0	11 mg/cm ³	3 mg/cm ³	24 mg/cm ³
pK_{Ca}	2,38	2,52	2,45

Les différences sont comprises dans la marge d'erreur expérimentale de la méthode ; elles sont donc trop faibles pour que l'on puisse prétendre que K_{Ca} varie avec la concentration de protéine ; K_{Ca} semble donc être une vraie constante d'équilibre ; nous adopterons la valeur moyenne :

$$pK_{Ca^{++}} = 2,45 \pm 0,07$$

et nous en déduisons la constante :

$$K_{Ca^{++}} = 3,5 \cdot 10^{-3} \pm 0,4 \cdot 10^3 \text{ M/litre.}$$

TABEAU II

Caractéristiques de l'expérience	(Ca ⁺⁺) M/l	$\log \frac{1}{(\text{Ca}^{++})}$	v_0 mm ³ HCl 0,1 N/min./cm ³
(a) $s_0 = 12 \text{ mg/cm}^3$	0	∞	2,7
$e = 139 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$	0,00091	3,04	2,4
	0,0091	2,04	1,7
	0,028	1,55	1,34
	0,046	1,35	1,1
	0,093	1,03	1,1
(b) $s_0 = 2,85 \text{ mg/cm}^3$...	0	∞	1,14
$e = 75 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$	0,00083	3,08	0,95
	0,0042	2,32	0,66
	0,0085	2,07	0,53
	0,044	1,36	0,41
	0,088	1,05	0,41
(c) $s_0 = 23,7 \text{ mg/cm}^3$...	0	∞	2,5
$e = 83 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$	0,00095	3,024	2,1
	0,00285	2,548	1,8
	0,00475	2,325	1,6
	0,00665	2,178	1,42
	0,0095	2,024	1,3
	0,0475	1,325	1,04
	0,095	1,024	1,0

Chaque détermination de K_{Ca} demandant au moins deux à trois jours d'expérimentation, il est nécessaire de s'assurer que l'activité de la trypsine n'a pas varié. En effet, la trypsine est préparée de la manière suivante : une quantité déterminée d'enzyme conservée dans HCl M/100, c'est-à-dire vers pH 2, est prélevée du stock à l'aide d'une micropipette et diluée avec de l'eau bidistillée. Cette solution diluée est gardée à la glacière pendant les deux ou trois jours d'expérience. Pour l'établissement de chacune des courbes, on prélève la quantité d'enzyme nécessaire et on la garde au thermostat à 35° C pendant

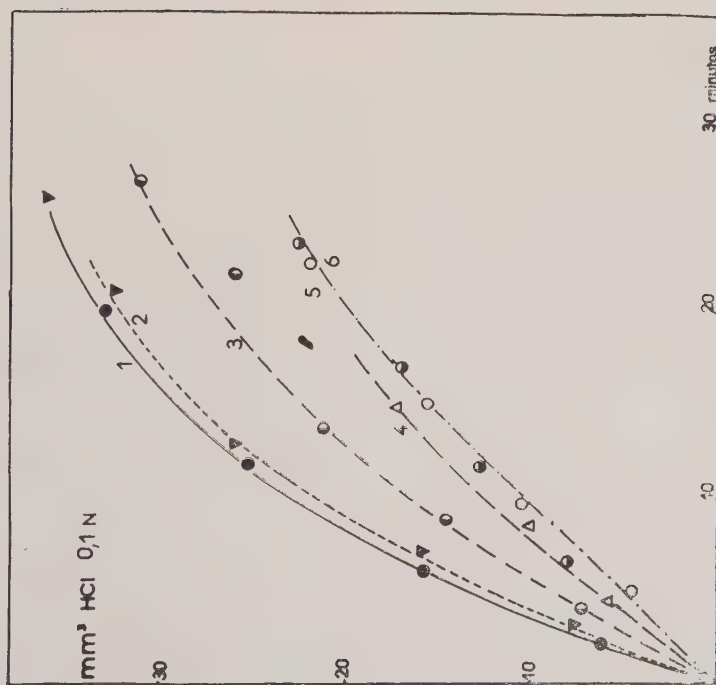


Fig. 2 — Action de différentes concentrations de calcium sur la vitesse de protéolyse : $e = 139 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$, $s_0 = 12 \text{ mg/cm}^3$: 1. sans calcium ; 2. calcium $0,00083 \text{ M}$; 3. calcium $0,0094 \text{ M}$; 4. calcium $0,028 \text{ M}$; 5. calcium $0,046 \text{ M}$; 6. calcium $0,072 \text{ M}$.

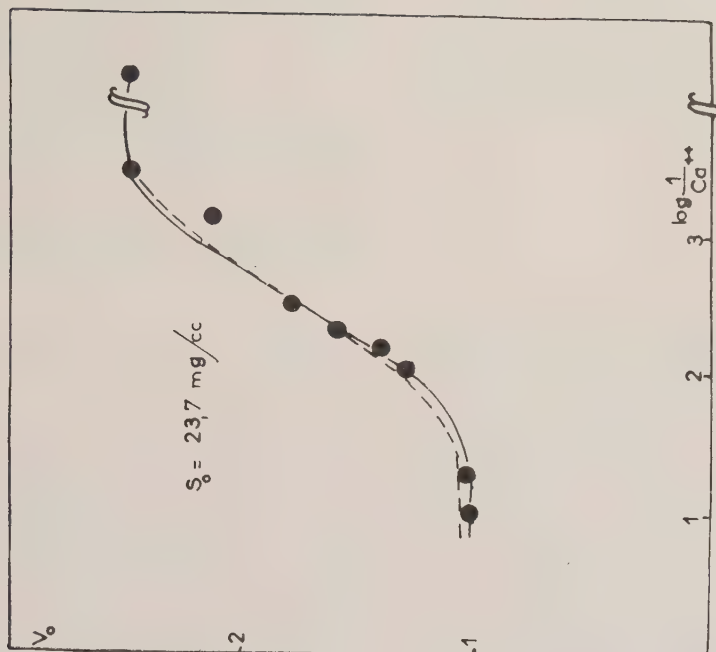


Fig. 3. — Courbe $v_0 = f(\log 1/[\text{Ca}^{++}])$. v_0 est exprimé en liaisons peptidiques détruites par cm^3 , par minute $\times 10^7$: $e = 85 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$, $s_0 = 23,7 \text{ mg/cm}^3$. En traits pleins : courbe expérimentale ; en traitsillés : courbe théorique.

trente minutes maximum, le temps nécessaire au titrage des témoins. L'activité absolue de cet enzyme a été mesurée chaque fois par la méthode de KUNITZ⁽⁷³⁾ utilisant la caséine comme substrat. En opérant ainsi, l'activité enzymatique reste constante pendant trois jours au moins.

Discussion.

Le problème qui se pose alors est celui de la signification de K_{Ca} . Si la molécule de lactoglobuline fixe au maximum un seul ion calcium, la constante K_{Ca} obtenue expérimentalement représente bien la constante de dissociation du complexe lactoglobuline-calcium. Or, la plupart des protéines peuvent généralement fixer plusieurs ions. Mais on peut penser qu'un seul calcium placé en position particulière par rapport à une liaison peptidique sensible intervient dans la partie initiale de la protéolyse. Par suite d'un excès de calcium, la fixation d'ions Ca^{++} en d'autres points ne diminuera pratiquement pas la quantité de calcium libre. Nous avons construit la courbe théorique correspondant à cette possibilité en prenant comme constante de dissociation $K_{Ca} = 3,5 \cdot 10^{-3}$ M/litre. La figure 3 montre une correspondance très satisfaisante entre la courbe théorique et la courbe expérimentale. Si plusieurs molécules de calcium intervenaient dans la protéolyse, la vitesse diminuerait plus lentement.

Nous pouvons en déduire qu'une seule molécule de calcium fixée par molécule de substrat a une influence sur la protéolyse. Toutefois, on pourrait objecter que, bien qu'il n'y ait aucun effet inhibiteur de l'ion Ca^{++} sur la trypsine, cet enzyme peut lui aussi fixer des ions, modifiant ainsi l'équilibre lactoglobuline-calcium ; l'équilibre que nous avons mis en évidence ne serait qu'un équilibre apparent. La constante de dissociation du complexe trypsine-calcium est connue depuis les travaux de GREEN et NEURATH⁽³⁸⁾ ; pour cette protéine K_{Ca} a une valeur de $4 \cdot 10^{-6}$ M, donc Ca^{++} a une grande affinité pour la trypsine. Mais dans nos expériences, la concentration de l'enzyme est toujours très faible devant la concentration du substrat et le calcul montre que cet effet est négligeable. Par conséquent, la constante K_{Ca} mesure bien l'inverse de l'affinité d'un groupe de la lactoglobuline pour le calcium.

La fixation du calcium par la caséine et par les protéines du sérum avaient été déterminées par d'autres méthodes (ultracentrifugation, diffusion des ions au travers d'un sac en collodion, électrodes à membranes). Voici quelques valeurs de la constante

intrinsèque trouvées dans la littérature pour la fixation du calcium par d'autres protéines :

Caséine	pK = 2,38 (technique du cœur de grenouille [58]).
	pK = 2,39 (ultracentrifugation [65, 18]).
Sérumalbumine .	pK = 2,34 (électrodes à membranes [15]).
Protéines du sérum	pK = 2,63 (65).

Les constantes intrinsèques obtenues pour les diverses protéines semblent donc très voisines.

2. Nombre maximum de calcium fixé par molécule de lactoglobuline.

Pour déterminer le nombre des ions Ca^{++} susceptibles de se fixer sur la lactoglobuline, nous avons utilisé la méthode de dosage de LINDERSTRÖM-LANG, qui permet de déduire le nombre de groupes titrables d'une molécule de lactoglobuline en tampon borate, entre pH 7 et pH 4.

En présence de calcium, la pente de la droite $VI = f(c)$ augmente et ceci d'autant plus que la concentration de calcium est plus élevée, ce qui correspond à une fixation des cations par la protéine. On peut donc connaître, par ce procédé, le nombre d'ions calcium liés en fonction de la concentration de calcium.

En mettant la loi d'action de masse sous la forme :

$$\frac{\text{Prot. tot.}}{Ca^{++} \text{ fixé}} = \frac{1}{m} + \frac{K}{m} \frac{1}{(Ca^{++})} \quad (3)$$

dans laquelle m représente le nombre maximum d'ions calcium fixés par molécule de protéine et K la constante de dissociation intrinsèque^(50, 51, 52).

Si l'on construit la droite $\frac{\text{prot. tot.}}{Ca \text{ fixé}} = f \left[\frac{1}{(Ca^{++})} \right]$ (fig. 4), l'intersection avec l'axe des ordonnées donne $1/m$ et la pente est inversement proportionnelle à la constante K . Nous nous contenterons de chercher $1/m$: l'erreur expérimentale est trop grande pour que l'on puisse déduire K par cette méthode ; par contre, elle permet d'avoir m à 2 unités près. Si l'on prend la valeur moyenne de l'intersection, on obtient $m = 7 \pm 2$ qui représente le nombre maximum de calcium fixés sur une molécule de protéine. Il est intéressant de noter que la sérumalbumine fixe au maximum huit ions calcium par molécule à pH 7,4⁽¹⁵⁾. Par conséquent, la lactoglobuline est susceptible de fixer plusieurs ions calcium, mais un seulement, sans doute le plus proche de la liaison peptidique, a une influence sur la vitesse de réaction.

3. Etude de la vitesse d'établissement de l'équilibre lactoglobuline-calcium.

Nous avons vu que l'action du calcium sur le substrat était une action lente et c'est ce qui nous a permis de conclure que l'inhibition observée n'était pas due à une modification de l'enzyme. Nous nous sommes proposé d'étudier quantitativement les constantes k et k' correspondant à l'association et à la dissociation de cet équilibre.

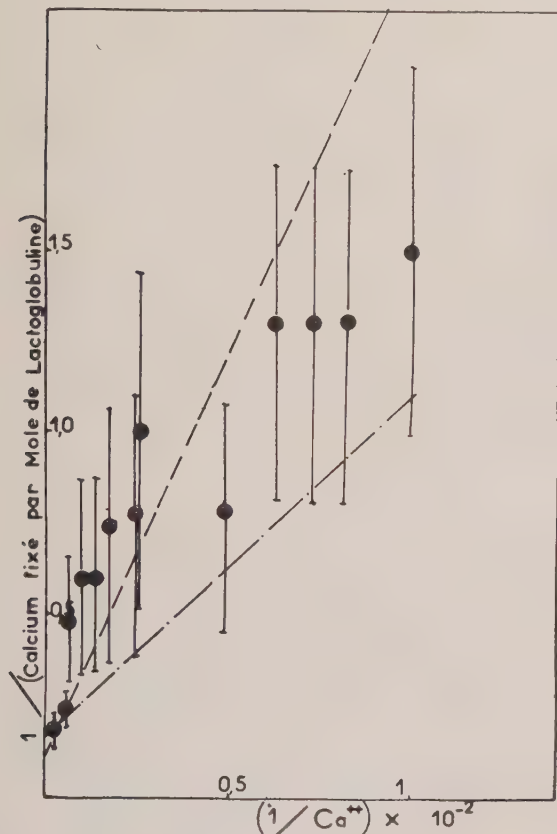
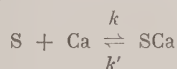


Fig. 4. — Détermination du nombre maximum de calcium fixés par molécule de lactoglobuline. En ordonnées : inverse du nombre de molécules de calcium liées par mole de protéine ; en abscisse : inverse de la concentration de calcium.

a) Aspect théorique des réactions réversibles. — Si l'on considère l'équilibre :



dans lequel (Ca) représente la concentration de calcium et (S) celle de la lactoglobuline à l'instant t , S_0 étant la concentration initiale de lactoglobuline, à chaque instant nous avons :

$$\frac{dS}{dt} = k(S)(Ca) - k'(S_0 - S) \quad (4)$$

Par suite d'un excès de calcium présent dans le milieu, nous pouvons écrire que $SCa \ll Ca$, c'est-à-dire que la concentration (Ca) reste pratiquement égale pendant toute la durée de la réaction.

Si (S_e) est la concentration de lactoglobuline libre à l'équilibre, l'intégration de l'équation (4) donne finalement :

$$[k(Ca) + k']t = 2,303 \log_{10} \frac{S_0 - S_e}{S - S_e}$$

Puisque nous considérons que (Ca) est constant, pour une valeur de (Ca) définie, la disparition de (S) en fonction du temps est une exponentielle ; d'autre part, on doit pouvoir définir un temps de demi-réaction tel que :

$$St_{0,5} = \frac{S_e - S_0}{2}$$

soit donc :

$$[k(Ca) + k']t_{0,5} = 2,303 \log_{10} 2$$

$t_{0,5}$ ne dépend donc que de (Ca). Pour une valeur de (Ca) déterminée, on peut trouver $t_{0,5}$ expérimentalement et en déduire k et k' , puisque l'on connaît leur rapport $K_{Ca} = k'/k = 3,5 \cdot 10^{-3}$ M/litre.

b) Détermination expérimentale de k et de k' . — Nous avons évalué ces constantes à partir de la différence des vitesses de protéolyse de la lactoglobuline, en absence et en présence de calcium, celui-ci étant ajouté à des temps variables avant le début de la protéolyse. La figure 5 indique les différentes courbes : la courbe 1 correspond à la cinétique de digestion de la lactoglobuline en présence de calcium ; en 2, le calcium est ajouté 10 secondes avant le début de la protéolyse ; en 3, 15 minutes avant ; en 4, 3 minutes avant ; en 5, 1 heure 30 avant le début de la protéolyse afin d'être certain que l'équilibre est atteint. Pour toutes ces expériences la concentration de la lactoglobuline est 11 mg/cm³ et la concentration de chlorure de calcium 0,012 M, celle de l'enzyme 146 γ/cm³.

L'allure des courbes montre nettement que l'équilibre est atteint lentement. Les courbes 3 et 5 correspondent à un équilibre déjà établi avant le début de la protéolyse ; en 2 et 4, au contraire, il s'établit en cours de protéolyse, la vitesse initiale est plus élevée et les courbes finissent par rejoindre la courbe 5 au bout d'un temps qui dépend du temps d'adjonction du calcium. L'étude de ces courbes permet donc de suivre l'établissement de l'équilibre. D'après l'intensité de la protéolyse à un temps déterminé, on peut déduire sur les différentes courbes la quantité de substrat non complexé, en fonction du temps d'incubation dans le calcium. C'est ce que représente la figure 6. Elle permet de trouver

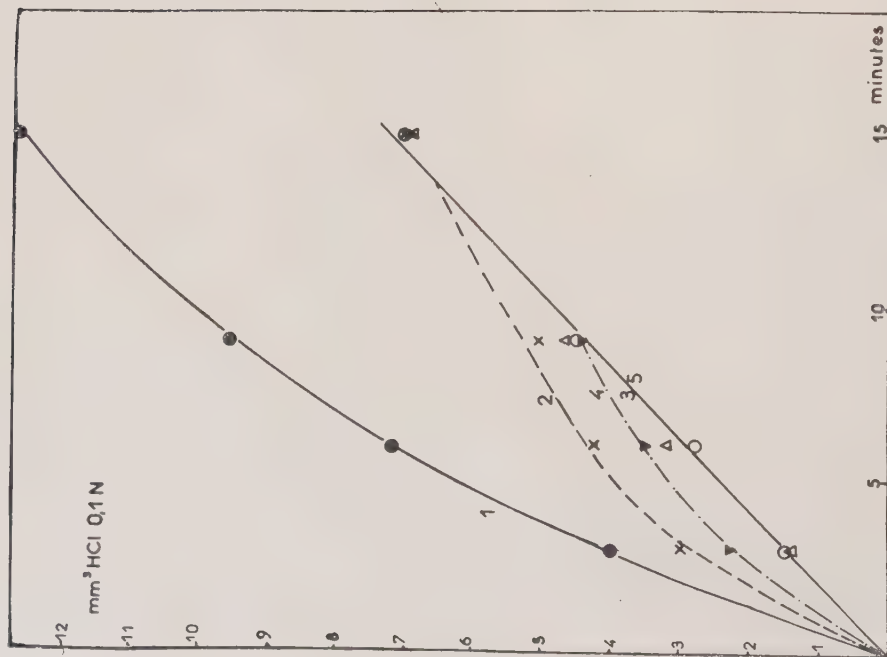


Fig. 5. — Action lente du calcium : $s_0 = 11 \text{ mg/cm}^3$, $e = 146 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$, $\text{Ca}^{++} = 0,012 \text{ M}$. Courbe 1 : sans calcium ; courbe 2 : le calcium est ajouté 10 secondes avant la trypsine ; courbe 3 : le calcium est ajouté 15 minutes avant la trypsine ; courbe 4 : le calcium est ajouté 3 minutes avant la trypsine ; courbe 5 : le calcium est ajouté 1 heure 30 avant la trypsine.

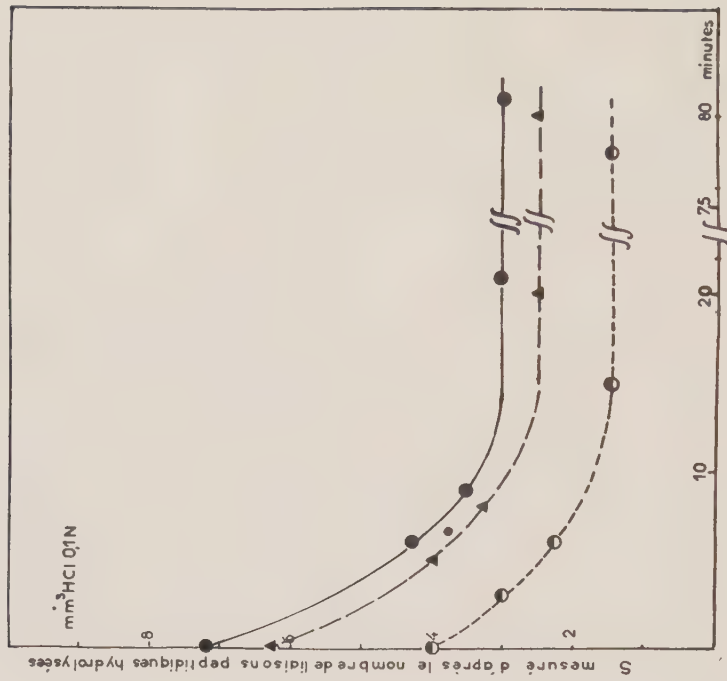


Fig. 6. — Durée d'établissement de l'équilibre. — En abscisse : temps d'action du calcium ; en ordonnées : (S) mesuré d'après l'intensité de la protéolyse pour une même durée d'hydrolyse exprimé en valeur relative en millimètres cubes d'HCl 0,1 N. Les trois courbes correspondent à différentes durées d'hydrolyse.

le temps de demi-réaction $t_{0,5}$; nous avons une bonne correspondance pour les trois courbes ; on trouve $t_{0,5} = 4$ minutes, d'où l'on déduit :

$$\begin{cases} k = 0,18 \text{ mol/l/sec.} \\ k' = 6,3 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1} \end{cases}$$

nous pouvons évaluer à 10 % l'erreur sur $t_{0,5}$. Par conséquent, k est connu à 0,02 M/l/sec. près.

Un calcul analogue peut être fait à partir des données de la figure 1. On trouve $t_{0,5} = 9$ minutes pour (Ca) = $4 \cdot 10^{-3}$, la valeur de s_0 étant 15,9 mg/cm³. Nous avons donc :

$$\begin{cases} k = 0,17 \text{ mol/l/sec.} \\ k' = 5,9 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1} \end{cases}$$

Il y a une correspondance assez satisfaisante entre ces deux expériences. Nous adopterons la valeur moyenne :

$$\begin{cases} k = 0,17 \pm 0,02 \text{ mol/l/sec.} \\ k' = 6,0 \cdot 10^{-4} \pm 0,6 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}. \end{cases}$$

L'établissement de l'équilibre lactoglobuline-calcium est une réaction lente. Pour des concentrations de Ca⁺⁺ plus élevées, il eût été difficile de le saisir, le temps de demi-réaction diminuant avec la concentration du calcium :

$$t_{0,50} = \frac{0,694}{k(\text{Ca}) + K_{\text{Ca}}}$$

Comment expliquer la lenteur de cet équilibre ? Vu les dimensions relativement petites de ce cation, il semble peu probable que l'on puisse invoquer des raisons purement stériques, la divalence du cation nécessitant deux groupes de la molécule pour se fixer pourrait fournir une explication plus vraisemblable.

C. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE L'ENZYME SUR LA VITESSE DE PROTÉOLYSE EN PRÉSENCE DE CALCIUM.

L'étude des variations de la vitesse de protéolyse en fonction de la concentration de l'enzyme montre une proportionnalité jusqu'à des concentrations d'enzyme de 300 γ/cm³ environ ; la cinétique suit encore la loi de MICHAELIS. Toutefois, aux très faibles concentrations d'enzyme (inférieures à 40 γ), l'activité enzymatique présente systématiquement en présence de calcium une valeur supérieure à celle que l'on pourrait attendre, sans qu'il soit possible de donner une explication satisfaisante de ce fait.

Toutes les concentrations d'enzyme utilisées dans la présente étude sont comprises dans les limites assurant la linéarité, c'est-à-dire jamais inférieures à 40 γ.

D. ETUDE DE LA DIGESTION COMPLÈTE.

1. Etude cinétique.

Plusieurs méthodes ont été employées ; d'abord la technique titrimétrique habituelle, en suivant la cinétique en fonction du temps pendant des temps suffisamment longs, 120 à 150 minutes, afin d'atteindre le palier marquant la fin de la réaction. Le même palier est obtenu avec ou sans calcium (pH 7 ou pH 8), mais dans le deuxième cas, celui-ci est atteint plus lentement comme l'indique la figure 7.

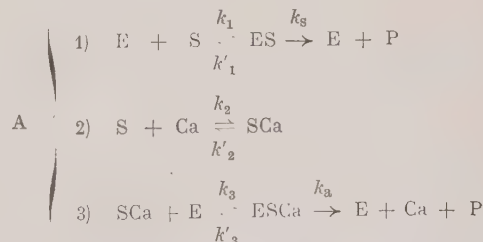
2. Électrophorèse sur papier des produits de réaction.

D'autre part, les produits de digestion ont été étudiés au moyen de l'électrophorèse sur papier. Nous avons préparé deux solutions. Dans chacune d'elles, la concentration de la lactoglobuline était 17,2 mg/cm³, celle de l'enzyme 230 γ/cm³ ; le chlorure de calcium était ajouté dans la seconde à une concentration de 0,076 M trois heures avant la protéolyse. La digestion a été effectuée pendant 16 heures à 35° C et à pH 8,2. L'électrophorèse sur papier des hydrolysats a été effectuée en tampon véronal pH 8,6 sous un champ de 150 volts pendant 1 heure 30. La coloration à la ninhydrine a révélé une identité parfaite dans les composants, que la protéolyse soit effectuée en présence ou en absence de calcium. Par conséquent, on peut conclure que la présence de calcium ne diminue ni la nature ni l'intensité de la protéolyse, mais seulement sa vitesse.

E. ETUDE CINÉTIQUE.

L'allure de la digestion en présence de calcium ne correspond à aucun des schémas classiques impliquant une inhibition compétitive ou non ni même une inhibition par blocage du complexe intermédiaire (27).

On a vu précédemment que dans les conditions où nous nous sommes placé, l'action du calcium s'exerce seulement sur le substrat, et d'autre part que les produits de la digestion totale sont les mêmes. Le schéma suivant semble le plus en accord avec les faits :



e est la concentration totale de l'enzyme, s la concen-

tration totale du substrat et (Ca), celle de l'ion calcium ; ES, ESCa, SCa, représentent les différents complexes formés.

Notons que l'équilibre lactoglobuline-calcium est déjà établi au temps zéro de la protéolyse puisque la lactoglobuline est toujours mise préalablement en présence de calcium.

Discussion.

L'équation (5) représente l'expression générale de la vitesse de réaction à chaque instant. Cette expression est valable quelle que soit la concentration de calcium et de substrat. Ses limites d'application en ce qui concerne la concentration de l'enzyme sont

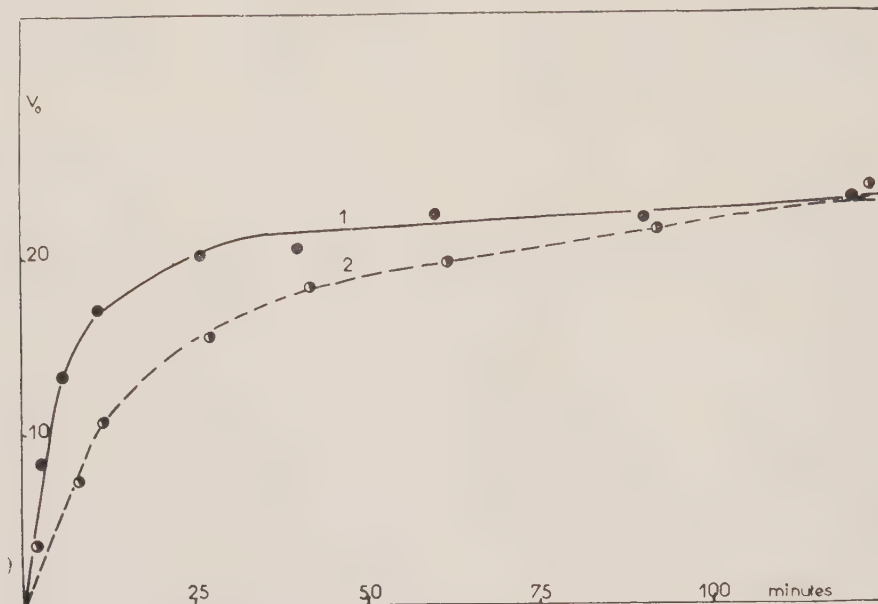


Fig. 7. — Etude de la digestion complète : $e = 84 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$, $s_0 = 3,2 \text{ mg}/\text{cm}^3$.
1. sans calcium ; 2. avec calcium 0,045 M.

D'autre part, à l'état stationnaire, on peut écrire les différents équilibres que permettent de formuler la loi de V. HENRI⁽⁴³⁾ et la loi d'action de masse.

$$\left\{ \begin{array}{l} 1) \quad K_m = \frac{k'_1 + k_s}{k_1} = \frac{(E)(S)}{(ES)} \\ 2) \quad K_{Ca} = \frac{k'_2}{k_2} = \frac{(S)(Ca)}{(SCa)} \\ 3) \quad K_a = \frac{k'_3 + k_a}{k_3} = \frac{(SCa)(E)}{(ESCa)} \end{array} \right.$$

A chaque instant, la vitesse est la somme des vitesses d'hydrolyse correspondant à l'équation 1) et 3) de A :

$$v = k_s (ES) + k_a (ESCa)$$

La résolution du système à l'état stationnaire conduit à une expression de la forme :

$$v = \frac{k_s e.s. K_{Ca} K_a + k_a e.s. K_m (Ca)}{K_m K_a K_{Ca} + K_m K_a (Ca) + K_a K_{Ca} s + K_m s (Ca)} \quad (5)$$

les mêmes que celle de la loi de HENRI-MICHAELIS^(32, 34). Mais au cours du notre travail expérimental, nous n'avons jamais utilisé de fortes concentrations d'enzyme et la concentration de calcium était toujours grande devant celle de l'enzyme et même devant celle du substrat.

La relation (5) donnant la vitesse de digestion peut être écrite sous la forme :

$$v = \frac{\frac{k_s}{K_m} e.s. + \frac{k_a (Ca)}{K_{Ca} K_a} e.s.}{1 + \frac{(Ca)}{K_{Ca}} + \frac{s}{K_m} + \frac{s(Ca)}{K_a K_{Ca}}}$$

1. Quand la concentration de calcium est nulle, on retrouve l'équation classique de HENRI-MICHAELIS, qui est encore applicable lorsque la concentration de calcium est très faible, c'est-à-dire dès que (Ca) est négligeable devant K_{Ca} , K_m et k_s ont déjà été déterminés pour le système lactoglobuline-trypsine.

2. Quand la concentration de calcium (Ca) est très grande, il résulte de la relation $(S)(Ca)/(SCa) = K_{Ca}$ que presque tout le substrat est sous forme de complexe SCa. En effet, lorsque (Ca) est de l'ordre de dix fois K_{Ca} (soit à peu près $3,5 \cdot 10^{-2}$ M), la concentration de substrat libre n'est plus que de 10 % de celle de SCa. Or, l'erreur expérimentale sur la détermination de v_o est de cet ordre ; la concentration de substrat libre est donc pratiquement négligeable ($s \simeq SCa$) et diminue de plus en plus à mesure que (Ca) augmente.

Si l'on porte graphiquement en abscisses la concentration de calcium et en ordonnées la vitesse maximum de protéolyse (exprimée en liaisons peptidiques détruites par milligramme d'azote de l'enzyme, par minute et par centimètre cube) préalablement déterminée au moyen de la représentation d'EADIE (voir tableau III), on obtient une courbe qui part de la vitesse k_s (pour $(Ca) = 0$) et qui décroît jusqu'à une valeur limite ; cette valeur limite représente k_a (fig. 8).

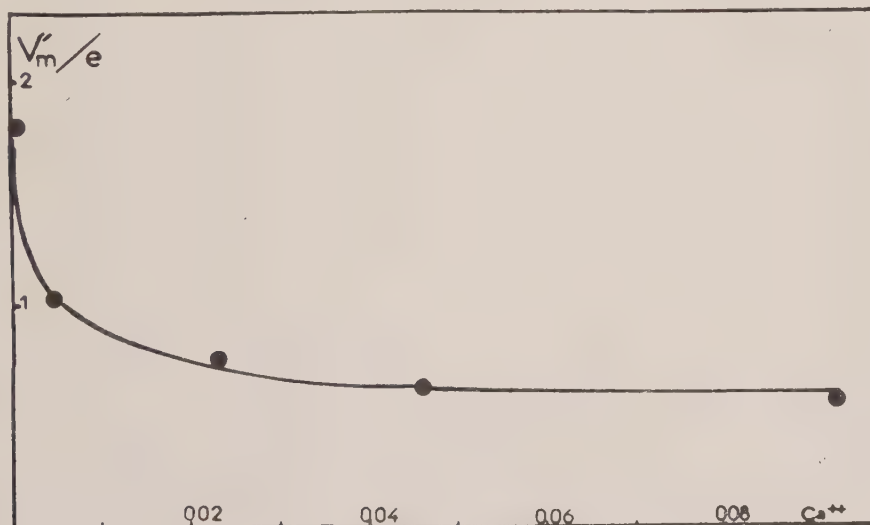


Fig. 8. — Variation de la vitesse maximum de protéolyse en fonction de la concentration de calcium. En abscisse : concentration de calcium en moles/litre ; en ordonnées : V'_m/e représente la vitesse maximum de protéolyse exprimée en liaisons peptidiques détruites par mg d'azote de l'enzyme et par min. $\times 10^5$.

Dès que K_{Ca} est négligeable devant (Ca), on n'a donc pratiquement plus de substrat libre. La protéine est laissée en présence de calcium pendant un temps largement suffisant avant l'attaque enzymatique pour que l'équilibre soit atteint. ES devient donc très petit et pratiquement négligeable devant ESCa. La vitesse de digestion se réduit à :

$$v = k_a(ESCa)$$

c'est-à-dire :

$$v_{Ca} = \frac{k_a e s}{K_a + s} \quad (6)$$

Aux fortes concentrations de calcium, c'est-à-dire à partir de la valeur limite, on peut trouver k_a et la constante de MICHAELIS expérimentale en utilisant par exemple la représentation d'EADIE ⁽²⁶⁾. k_s et K_m sont déjà connus.

Pour les fortes concentrations de calcium, la pente de la droite représentant v_o en fonction de v_o/s_o donne la valeur de $-K'_m$. La constante expérimentale ainsi déterminée est égale à K_a . Nous avons fait plusieurs déterminations de ce genre pour diverses concentrations de calcium (fig. 9).

En résumé, on peut diviser en trois zones la marche de la protéolyse en présence de calcium, ces trois zones dépendant essentiellement de la concentration du calcium présent.

I. Zone I. $(Ca) \leq 10^{-4}$ M.

(Ca) est très petit ou nul ; il n'y a pas encore d'effet visible sur la protéolyse :

$$v = k_s(ES) \quad \text{et} \quad v = \frac{k_s e s}{K_m + s}$$

Dans cette région, la cinétique correspond à l'équation de MICHAELIS-HENRI.

II. Zone II. $10^{-4} \text{ M} < (\text{Ca}) < 3 \text{ à } 5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$.

(Ca) est suffisamment grand pour que l'action du calcium soit notable, mais cette influence n'a pas encore atteint son maximum. La cinétique obéit à l'équation complexe que nous avons formulée précédemment :

$$v = k_s(\text{ES}) + k_a(\text{ESCa})$$

et la vitesse est donnée par la relation (5).

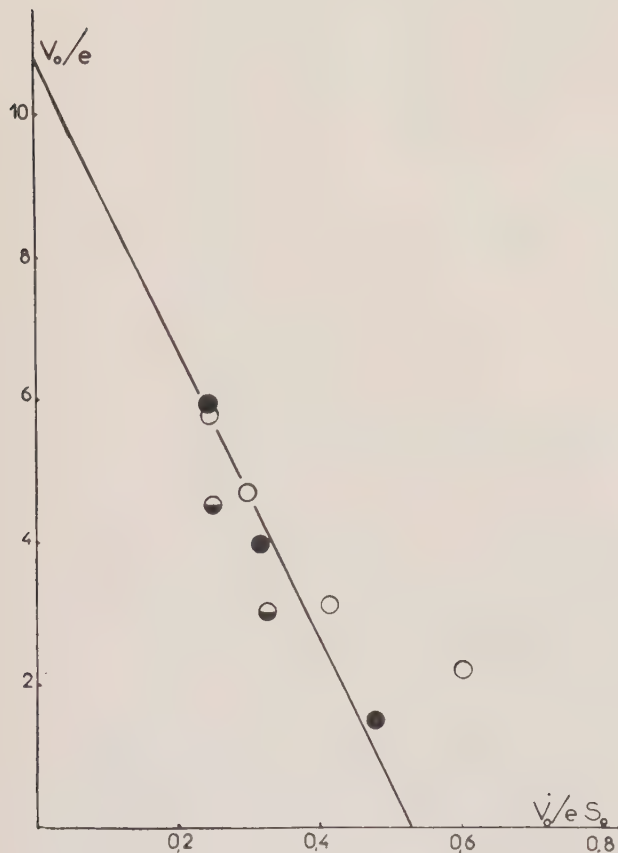


Fig. 9. — Détermination expérimentale de la constante K_a . En ordonnées : v_0/e exprimé en liaisons peptidiques détruites par minute et pour 1 mg/cm^3 d'enzyme ; en abscisses : $v_0/e S_0$ exprimé en liaisons peptidiques détruites par minute pour 1 mg/cm^3 d'enzyme et pour 1 mg/cm^3 de substrat.

● : $0,023 \text{ M Ca}^{++}$ ● : $0,046 \text{ M Ca}^{++}$ ○ : $0,093 \text{ M Ca}^{++}$

III. Zone III. $(\text{Ca}) > 3 \text{ à } 5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$.

(Ca) est suffisamment grand pour que l'on puisse négliger K_{Ca} devant (Ca). A la limite, lorsque (Ca) est égal à $3,5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, pratiquement tout le substrat est sous la forme de complexe calcium-substrat d'après ce que nous avons dit précédemment, $v = k_a(\text{ESCa})$, et la vitesse est donnée par la relation (6).

Le tableau III résume un certain nombre de mesures effectuées en présence de calcium. Dans chaque série d'expériences, la concentration du calcium et de l'enzyme restant constante, nous faisons varier la concentration du substrat. Afin de pouvoir comparer entre elles les différentes expériences, nous exprimons pour chacune d'elles les vitesses initiales et maximales par unité d'enzyme (v_0/e , V_m/e , etc.).

Le tableau IV donne les différentes constantes d'affinité et de vitesse trouvées pour les réactions 1), 2) et 3) et permet d'établir une comparaison. On remarquera que l'affinité de l'enzyme pour le substrat combiné au calcium est environ trois fois moindre que lorsqu'il n'y a pas de calcium dans le milieu ; la valeur de K_a est de $5,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \pm 0,6 \cdot 10^4 \text{ M}$ alors que celle de K_m n'est que de $1,7 \cdot 10^4 \text{ M} \pm 0,2 \cdot 10^4 \text{ M}$. De même, la comparaison des constantes de vitesse indique que la vitesse de digestion du complexe lactoglobuline-calcium est environ trois fois plus faible que celle de la protéine seule ; mais le complexe est encore hydrolysé par la trypsine.

F. INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE : ÉNERGIE ET ENTROPIE D'ACTIVATION.

Nous nous sommes proposé d'établir les données thermodynamiques correspondant à la formation et à l'activation des complexes de chacune des réactions du schéma adopté précédemment pour expliquer la marche de la protéolyse en présence de calcium.

1. Formation des complexes.

Dans le cas présent, la variation d'énergie libre ΔF , correspondant à la formation du complexe enzyme-substrat, peut être déterminée immédiatement à partir de la constante de MICHAELIS. On a : $\Delta F = + RT \log_n K_m$. Dans l'expression $K_m = (k' + k_s)/k_1$, si k_s est petit devant k' , K_m représente la constante de dissociation du complexe. Ceci se vérifie dans le système lactoglobuline-trypsine ; en effet, lorsque l'on fait varier la température, K_m reste pratiquement constant bien que k_s varie considérablement (⁵⁵).

Cette simplification s'applique encore à la formation du complexe lactoglobuline-calcium trypsine (ESCa), l'équilibre entre le substrat et le calcium ne variant pas avec la température comme nous le verrons par la suite.

Lorsque l'on peut assimiler K_m à la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat, ses variations avec la température peuvent être interprétées d'après les données thermodynamiques classiques. La pente de la droite $K_m = f(1/T)$ permet

de calculer la *variation d'enthalpie* correspondant à la formation de ce complexe. Or, nous venons de voir que lorsque T varie, K_m ne varie pas. L'énergie de formation du complexe ES est donc pratiquement nulle : ($\Delta H_1 \simeq 0$). Il en est de même pour la formation du complexe ESCa ($\Delta H_3 \simeq 0$).

Connaissant la variation de l'énergie libre et la variation d'enthalpie, on obtient la *variation d'entropie* qui correspond à la formation des différents complexes au moyen de la relation :

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta F}{T}$$

TABLEAU III

(Ca)	s_0	e	v_0	v_0/e	v_0/e_0	V_m/e		K'_m
	mg/cm ³	γ /cm ³	Liaisons pept/min. /cm ³ $\times 10^7$	Liaisons pept/min. /cm ³ pour 1 mg/cm ³ d'enzyme $\times 10^7$		Liaisons pept/min. /cm ³ pour 1 mg/cm ³ d'enzyme $\times 10^7$	Liaisons pept/min. /cm ³ pour mg/cm ³ d'azote d'enzyme $\times 10^5$	M/l $\times 10^4$
0								
0,0045	25,8	155	1,9	12,5	0,49	16,5	1,8	1,7
	12,9		1,53	9,3	0,72		1,03	2,8
	7,2		1,1	7,1	1,0			
	4,2		0,77	4,97	1,18			
0,023	23,5	153	0,9	5,9	0,25	12	0,75	6,5
	12		0,6	3,9	0,32			
	3,1		0,23	1,5	0,48			
0,046	17,4	149	0,66	4,43	0,254	10,1	0,63	6,4
	9,1		0,44	2,95	0,324			
	4,5		0,24	1,61	0,362			
0,093	29,7	152	0,9	5,95	0,24	9,5	0,59	5,5
	15,2		0,7	4,6	0,3			
	7,3		0,48	3,15	0,43			
	3,5		0,33	2,17	0,63			

(*) Tous les calculs sont faits en admettant que la lactoglobuline a un poids moléculaire de 35.000 et qu'elle se coupe en 35 liaisons peptidiques par mole ; le pourcentage d'azote de la trypsine est 16 %.

TABLEAU IV

Réaction (1) $E + S \xrightleftharpoons[k'_1]{k_1, k_s} ES \rightarrow E + P$		Réaction (2) $S + Ca \xrightleftharpoons[k'_2]{k_2} SCa$		Réaction (3) $E + SCa \xrightleftharpoons[k'_3]{k_3, k_a} ESCa \rightarrow E + P + Ca$	
K_m	k_s	K_{Ca}		K_a	k_a
M/l	Liaisons pept. détruites par min./cm ³ et par mg d'azote de l'enzyme	M/l		M/l	Liaisons pept. détruites par min./cm ³ et par mg d'azote de l'enzyme
$1,7.10^{-4} \pm 0,3.10^{-4}$	$1,8.10^{-5} \pm 0,3.10^{-5}$	$3,5.10^{-3} \pm 0,5.10^{-3}$ avec : $k_2 = 0,17 \pm$ $0,02 \text{ M/l/sec.}$ $k'_2 = 6.10^{-4} \pm$ $0,6.10^{-4} \text{ sec}^{-1}$		$5,8.10^{-4} \pm 0,8.10^{-4}$	$0,6.10^{-4} \pm 0,06.10^{-5}$

Les différentes constantes, calculées à 35°, sont indiquées dans le tableau V.

L'augmentation d'entropie montre que la formation de ces complexes s'accompagne d'un désordre moléculaire qui correspond probablement à la libération de molécules d'eau. Il est légèrement inférieur lorsque la lactoglobuline est déjà complexée avec le calcium.

2. Activation des complexes intermédiaires.

a) *Energie libre d'activation.* — La deuxième partie de la réaction correspond à la scission du complexe pour donner des produits de réaction et régénérer l'enzyme. Le complexe intermédiaire, avant de se scinder en produits de réaction et enzyme, doit franchir une certaine barrière de potentiel, il doit passer par un état « activé » ES^* , ES^* étant la configuration du complexe au sommet de la barrière de potentiel. On a donc la suite de réactions :



D'après la théorie des vitesses absolues (^{29, 82, 83}), la constante de vitesse du premier ordre k_s correspondant à la formation des produits de réaction P est :

$$k_s = \kappa \frac{R T}{N h} K^*$$

où K^* est la constante d'équilibre entre ES et ES^* , R la constante des gaz, T la température absolue, N le nombre d'AVOGADRO, h la constante de PLANCK et κ un coefficient de transmission égal à l'unité dans la plupart des cas.

Le produit $\kappa RT/Nh$ a les dimensions d'un facteur de fréquence ; il représente la fréquence avec laquelle le complexe activé traverse la barrière de potentiel. C'est une constante universelle. A 25° C, ce facteur est égal à $6,25 \cdot 10^{12}$.

La connaissance de K^* permet de calculer l'énergie libre d'activation du complexe à une température donnée :

$$\Delta F^* = - RT \log_n K^*$$

Les valeurs correspondant à l'activation des complexes ES et $ESCa$ sont données dans le tableau V.

b) *Energie et entropie d'activation.* — La variation de la vitesse d'une réaction en fonction de la température est donnée par la relation :

$$\frac{d \log_n k}{dT} = \frac{E}{RT^2}$$

(E représente l'incrément critique, R la constante

des gaz, T la température absolue, k la vitesse de la réaction), soit pour deux températures T_1 et T_2 :

$$\log_{10} \frac{k_2}{k_1} = - 2,3 \frac{E}{R} (1/T_1 - 1/T_2)$$

Si l'on porte le logarithme décimal de la constante de vitesse à différentes températures en fonction de $1/T$, on obtient une droite dont la pente permet de calculer E .

Beaucoup de déterminations de E ont été faites en portant non plus le logarithme de la constante de vitesse en fonction de la température absolue, mais simplement le log de la vitesse d'apparition des produits de réaction : $\log v_0$ (^{40, 80, 68}). Cette manière de faire implique des réserves (^{17, 33, 58}). Elle n'est correcte que si K_m est petit devant la concentration de substrat ou s'il ne varie pas avec la température. Comme nous l'avons vu plus haut, ce dernier cas est celui du système lactoglobuline-trypsine. Nous avons donc utilisé la variation de $\log v_0$ en fonction de $1/T$. Pour plus de sécurité, la détermination de E en présence de calcium a été faite pour plusieurs concentrations de substrat (fig. 10).

L'enthalpie d'activation $\Delta H^\ddagger$ est calculée à partir de l'énergie d'activation par la relation :

$$\Delta H^\ddagger = E - RT$$

et l'entropie d'activation du complexe à partir de :

$$\Delta F^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger$$

Notre intention était surtout de comparer les constantes thermodynamiques de la réaction (1) avec celles de la réaction (3) espérant saisir la nature des modifications qu'entraîne la présence de calcium. Des mesures de vitesse ont été faites à plusieurs températures en présence et en absence de calcium et pour plusieurs concentrations de substrat et de calcium. Dans tous les cas, on obtient des droites, $\log v_0$ en fonction de $1/T$, de même pente comme le montre la figure 10. Ce qui prouve :

— que l'énergie d'activation n'est pas modifiée par la présence de calcium quelle que soit la concentration. Par conséquent, la fixation de calcium ne modifie pas sensiblement la structure du complexe activé ;

— que l'on trouve la même énergie d'activation en présence de calcium pour diverses concentrations de substrat, par suite on peut en déduire que K_a , de même que K_m , ne varie pas avec la température ($\Delta H_s \simeq 0$) et, par conséquent, l'équilibre lactoglobuline-calcium n'est pas modifié par la température.

Par contre, la variation d'entropie qui correspond à l'activation du complexe $ESCa$ ($\Delta S_s^* = 24$ U.E.)

est légèrement plus faible que celle du complexe ES ($\Delta S^*_1 = 27$ U.E.). La présence de calcium diminue le désordre qu'accompagne cette activation.

Néanmoins, il semble étonnant de constater la forte énergie d'activation trouvée dans le cas de ces réactions ($\Delta H^* = 28.000$ cal.). En effet, les valeurs trouvées dans la littérature correspondent à des

LINDERSTRÖM-LANG ⁽⁶¹⁾ d'autre part, trouve pour l'hydrolyse de la lactoglobuline une énergie d'activation qui varie en fonction de la température pour atteindre un maximum d'environ 18.000 cal. Toutefois, cet auteur a fait ses expériences en tampon $\text{NH}_4^+-\text{NH}_3$ 0,1 M (à pH 8,3 et à 30° C), dont le pH varie considérablement avec la température NH_3 .

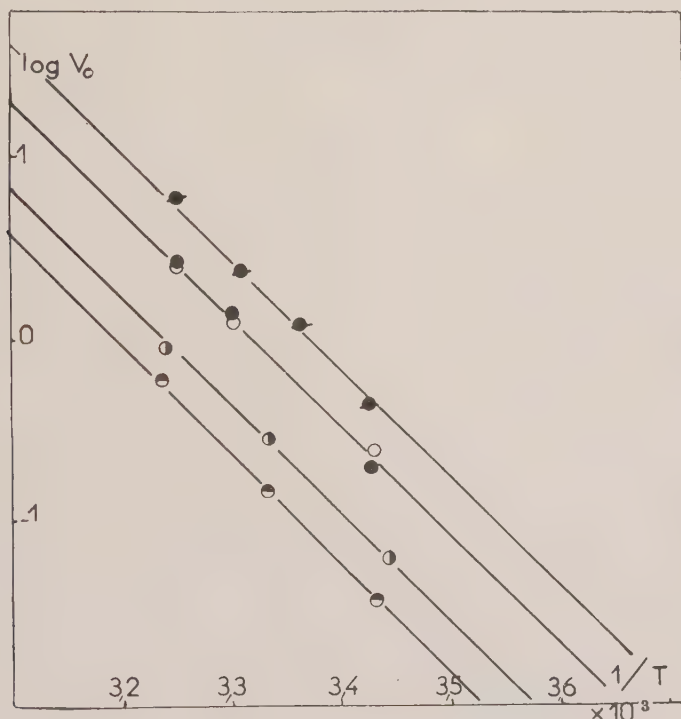


Fig. 10. — Détermination de l'énergie d'activation de la réaction en tampon borate pH 7. En ordonnées : on porte le logarithme décimal de la vitesse initiale de protéolyse ; en abscisses : l'inverse de la température absolue $\times 10^3$.

- sans calcium : $e = 281 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$, $s_0 = 20,4 \text{ mg/cm}^3$.
- Ca^{++} : 0,0375 M : $e = 409 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$, $s_0 = 18,4 \text{ mg/cm}^3$.
- ◐ Ca^{++} : 0,052 M : $e = 280 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$, $s_0 = 5,13 \text{ mg/cm}^3$.
- ◑ Ca^{++} : 0,045 M : $e = 371 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$, $s_0 = 4,55 \text{ mg/cm}^3$.
- sans calcium et sans ClNa dans le tampon :
 $e = 327 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$, $s_0 = 10 \text{ mg/cm}^3$.

énergies d'activation plus faibles et à une forte négativité de l'entropie, sauf dans le cas du chymotrypsinogène.

Voici les valeurs données par BUTLER ⁽¹³⁾ correspondant à l'hydrolyse trypsique de différents corps :

	$\Delta H =$	ΔS^*
Benzoyl-argininamide.....	14.000 cal.	— 6,2
Chymotrypsinogène.....	16.300 cal.	+ 8,5
Sturine.....	11.800 cal.	— 4,7

3. Discussion.

Plusieurs hypothèses se présentent pour rendre compte de ce fort accroissement de l'entropie et de cette grande énergie d'activation.

1. L'énergie d'activation mesurée expérimentalement peut correspondre à l'énergie d'activation

vraie, dans ce cas la trypsine catalyserait faiblement la réaction, ce qui est peu probable.

2. Il peut se produire une variation de pH avec la température. BUTLER ⁽¹³⁾ met en garde contre cette cause d'erreur possible ; en effet, dit-il, la plupart des réactions sont très sensibles aux changements de pH qui, toutefois, sont généralement très petites dans la région du pH optimum et l'effet de la température sur le pH est négligeable. Dans notre cas, nous opérons en tampon borate M/5 dont les variations de pH entre 15° et 35° sont de l'ordre de 0,05 pH, donc négligeables, et cette hypothèse doit être écartée.

3. Le phénomène peut être plus complexe et impliquer une dénaturation qui expliquerait le fort accroissement d'entropie.

4. Cette augmentation d'entropie peut être due à un départ de molécules d'eau ; le ClNa présent (0,1 M), ou un autre ion du tampon, produit une hydratation de la molécule de lactoglobuline et celle-ci, en passant à la forme activée, perd ses molécules d'eau.

L'expérience nous a montré qu'une influence quelconque de ClNa était à éliminer (voir fig.10),

5. D'autres interactions entre la protéine et le milieu restaient possibles ; on pouvait envisager, par exemple, une action quelconque des ions borate. C'est pourquoi nous avons comparé les variations de la vitesse de protéolyse à diverses températures en tampon phosphate (phosphate monopotassique, phosphate disodique 0,1 M, à pH 7). Deux séries d'expériences ont été effectuées entre 15° et 35° (fig. 11). La cinétique est suivie par mesure de l'absorption dans l'ultraviolet du filtrat après précipitation trichloracétique (voir chapitre I^{er}). De même que pour le borate, la variation du pH avec la température est négligeable.

Si l'on porte pour chaque expérience le logarithme de v_0 en fonction de $1/T$, on obtient des droites parallèles, mais dont la pente est plus faible que dans le cas du borate (fig. 12) ; par conséquent, l'énergie d'activation est plus faible ($\Delta H^* = 19.000$ cal.) On doit donc admettre que l'on mesure en tampon borate la somme de deux phénomènes : l'activation du complexe et une action du borate variant avec la température. Toutefois, le pH d'une solution de lactoglobuline en tampon borate ne varie pratiquement pas avec la température (0,04 pH entre 18° et 35°). Par conséquent, il faut chercher ailleurs la cause de cette variation.

Nous avons été amené à étudier comparativement l'allure de la protéolyse en tampon borate et en

tampon phosphate pH 7 à deux températures (fig. 13). Il résulte de cette étude :

1. qu'à 35°, le borate n'affecte ni la vitesse de protéolyse de la lactoglobuline, ni la constante de MICHAELIS du système.

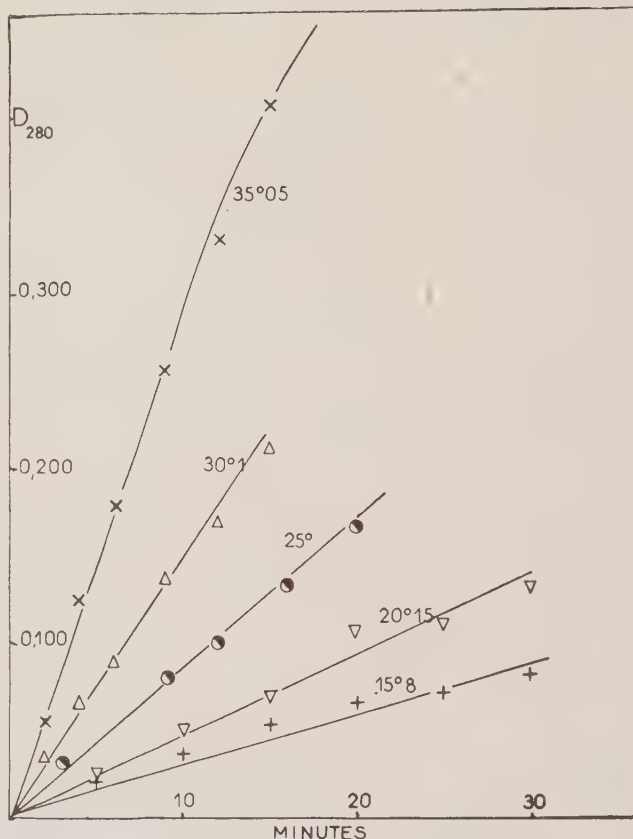


Fig. 11. — Variation de la vitesse de protéolyse à différentes températures en tampon phosphate à pH 7 : $s_0 = 16,5$ mg/cm³, $e = 213$ γ/cm³.

2. qu'à 25°, le borate diminue considérablement la vitesse d'hydrolyse, quoi qu'il ne modifie pas la valeur de K_m . On a donc une inhibition non compétitive de la réaction sous l'influence des ions borate. La diminution de la vitesse observée expérimentalement à cette température (voir fig. 13) correspond à 12 % près à celle que permettaient de déduire les valeurs respectives de l'énergie d'activation dans les deux milieux.

Nous pouvons donc conclure que le borate exerce sur la protéolyse de la lactoglobuline par la trypsine une inhibition du type non compétitif aux températures inférieures à 35°.

On observe également une inhibition totale de l'hydrolyse de la caséine en tampon borate 0,1 M,

même lorsque l'on ajoute des quantités de trypsine de l'ordre de 1 mg/cm³. La fixation du borate, probablement par le substrat, se fait avec une variation d'enthalpie qui n'est pas négligeable, ce qui explique les fortes valeurs de $\Delta H^\ddagger$ trouvées précédemment ; ce que l'on mesurait correspondait

d'une part à l'activation du complexe, d'autre part à la fixation de borate par la protéine.

Par conséquent, l'étude des constantes thermodynamiques nous a permis de mettre en évidence une action qui serait probablement restée inaperçue par une étude cinétique simple.

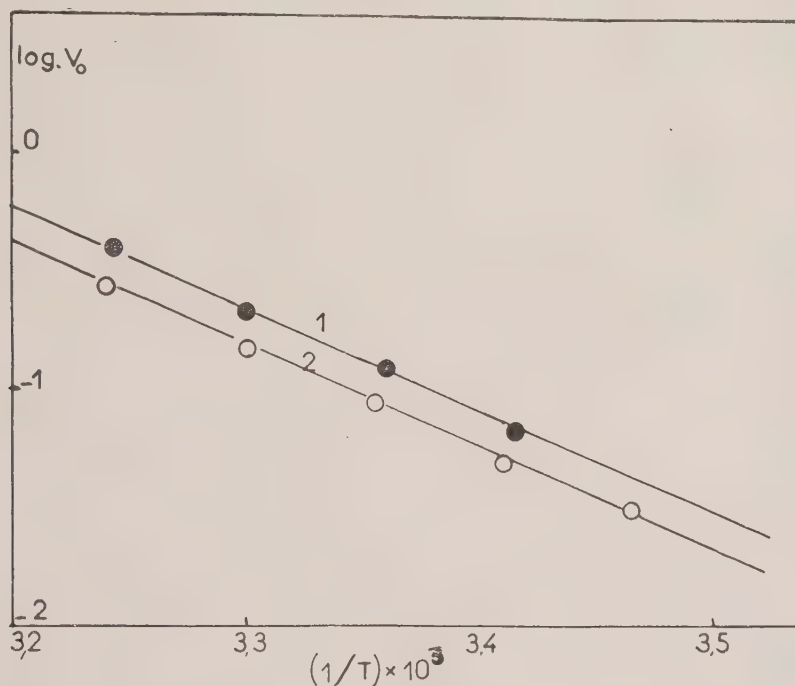


Fig. 12. — Détermination de l'énergie d'activation en tampon phosphate pH 7. La courbe 1 correspond à $e = 288 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$, $s_0 = 17 \text{ mg/cm}^3$; la courbe 2 correspond à $e = 213 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$, $s_0 = 16,5 \text{ mg/cm}^3$.

TABEAU V

Réaction (1)		Réaction (2)	Réaction (3)	
$\text{E} + \text{S} \xrightleftharpoons[k'_1]{k_1} \text{ES} \xrightarrow{k_2} \text{E} + \text{P}$		$\text{S} + \text{Ca} \xrightleftharpoons[k'_2]{k_2} \text{SCa}$	$\text{E} + \text{SCa} \xrightleftharpoons[k'_3]{k_3} \text{ESCa} \xrightarrow{k_a} \text{E} + \text{P}$	
Formation du complexe	Activation du complexe	Formation du complexe	Formation du complexe	Activation du complexe
<i>en tampon borate</i>			<i>en tampon borate</i>	
$\Delta F_1 = -5.300 \pm 50 \text{ cal}$	$\Delta F_1^* = 19.700 \pm 50 \text{ cal}$	$\Delta F_2 = 3.500 \pm 50 \text{ cal}$	$\Delta F_3 = -4.700 \pm 50 \text{ cal}$	$\Delta F_3^* = 20.600 \pm 50 \text{ cal}$
$\Delta H_1 \approx 0$	$\Delta H_1^* = 28.000 \pm 500 \text{ cal}$	$\Delta H_2 \approx 0$	$\Delta H_3 \approx 0$	$\Delta H_3^* = 28.000 \pm 500 \text{ cal}$
$\Delta S_1 = 17 \text{ U.E.}$	$\Delta S_1^* = 27 \text{ U.E.}$	$\Delta S_2 = 11 \text{ U.E.}$	$\Delta S_3 = 15 \text{ U.E.}$	$\Delta S_3^* = 24 \text{ U.E.}$
<i>en tampon phosphate</i>				
$\Delta F_1 = -5.300 \pm 50 \text{ cal}$	$\Delta F_1^* = 19.700 \pm 50 \text{ cal}$			
$\Delta H_1 \approx 0$	$\Delta H_1^* = 19.000 \pm 500 \text{ cal}$			
$\Delta S_1 = 17 \text{ U.E.}$	$\Delta S_1^* = -3 \text{ U.E.}$			

CONCLUSION

Cette étude a permis de préciser le mode d'action du calcium sur la protéolyse de la lactoglobuline par la trypsine. On devait envisager une possibilité d'action à la fois sur l'enzyme et sur le substrat.

Nous avons montré que lorsque la lactoglobuline se trouve en présence de calcium, il s'établit un équilibre. Quoique cette protéine soit susceptible de fixer plusieurs ions calcium par molécule, il résulte de la correspondance entre les courbes expérimentales et les courbes théoriques impliquant un équilibre

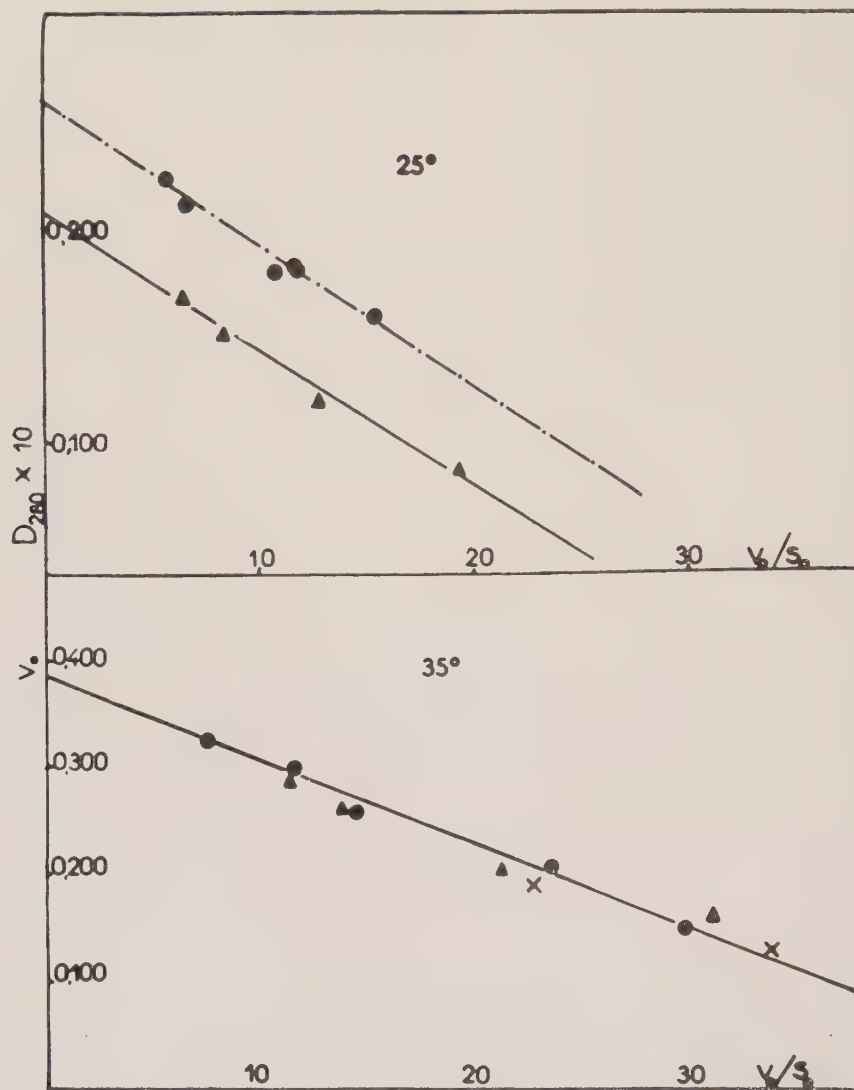


Fig. 13. — Comparaison de K_m et de V_m à pH 7. — ● : en tampon phosphate ; ×, ▲ : en tampon borate. En haut à 25° C ($\epsilon = 254 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$) ; en bas à 35° C ($\epsilon = 130 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$).

Mais l'expérience montre que, dans les conditions expérimentales qui ont été décrites, le calcium n'exerce aucune influence sur la trypsine. Ce fait est en accord avec d'autres travaux récents dont les auteurs pour la plupart n'attribuent au calcium qu'un rôle de protecteur contre l'inactivation de la trypsine.

molécule à molécule, qu'un seul ion calcium fixé par molécule de substrat modifie la protéolyse. C'est cet équilibre particulier que nous avons étudié (la constante de dissociation K_{Ca} est $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ M/litre}$) ; il ne s'établit que lentement en fonction du temps et nous avons pu calculer les constantes k

et k' correspondant à la vitesse de formation et de dissociation de ce complexe ($k = 0,17 \pm 0,02$ moles/l sec. et $k' = 6.10^{-4} - 0,6.10^{-4}$ sec⁻¹).

Pour expliquer l'allure de la protéolyse en présence de calcium, nous avons proposé un schéma simple qui rend compte des principaux faits expérimentaux. Le complexe lactoglobuline-calcium est encore susceptible de subir l'hydrolyse trypsique, quoiqu'il présente pour cet enzyme une affinité plus faible que la lactoglobuline seule. K_a est égal à $6.10^{-4} \pm 0,6.10^{-4}$ M/litre alors que K_m a une valeur de $1,7 \pm 0,3.10^{-4}$ M/litre. Les produits de la réaction sont les mêmes, mais apparaissent avec une vitesse environ trois fois plus faible (la constante spécifique k_a est $0,6.10^{-5} \pm 0,06.10^{-5}$ liaisons peptidiques détruites par minute et par milligramme d'azote de l'enzyme, alors que k_s correspondait à $2 \pm 0,3.10^{-5}$ liaisons peptidiques détruites par minute et par milligramme d'azote de l'enzyme).

Le complexe lactoglobuline-calcium se comporte donc comme un composé défini qui est entièrement hydrolysable par la trypsine, mais avec des constantes

différentes de celles que nous avons obtenues dans le cas de la lactoglobuline seule.

Des mesures faites à différentes températures avec et sans calcium permettent de conclure que l'équilibre lactoglobuline-calcium ne varie pas avec la température. D'autre part, l'énergie d'activation du complexe n'est pas modifiée par la fixation de calcium sur la protéine, ce qui prouve qu'aucun changement profond dans la structure du complexe activé n'est produit par cette fixation. Nous devons noter toutefois que la formation ainsi que l'activation du complexe enzyme-substrat s'accompagnent d'une variation d'entropie un peu moins grande en présence de calcium. Le calcium, en se fixant sur la molécule de lactoglobuline, supprime la liberté de quelques groupes d'atomes dans le complexe activé, ce qui rend l'attaque enzymatique plus difficile.

L'étude des constantes thermodynamiques a permis de mettre en évidence une interaction entre la lactoglobuline et les ions borate. Cette interaction, aux températures inférieures à 35°, entraîne une inhibition non compétitive de la réaction de protéolyse.

CHAPITRE IV

ACTION DE L'AMMONIUM

On ne trouve que peu de renseignements sur l'action de l'ammonium et aucune étude d'ensemble ne paraît avoir été entreprise sur ce sujet.

On a surtout étudié l'influence des ions ammonium sur le processus de formation de la trypsine. Dans leur travail sur l'action du calcium dans la transformation autocatalytique du trypsinogène en trypsine, MACDONALD et KUNITZ étudient aussi l'action de différents sels d'ammonium. Ces auteurs montrent que la vitesse de formation de la trypsine active est fortement diminuée en présence de chlorure d'ammonium, mais que la vitesse de formation de la trypsine inactive est diminuée dans les mêmes proportions si bien que finalement le pourcentage de trypsinogène transformé en enzyme actif reste inchangé (²³).

Il n'y a pas eu d'investigation systématique concernant l'action de l'ammonium sur l'activité de la trypsine. Toutefois, quelques mesures isolées ont été effectuées : NH_4^+ n'inhibe pas l'hydrolyse de la l-benzoyl argininamide (²³) d'après HARMON et NIEMANN ; d'autre part, il semble sans action sur l'inactivation de la trypsine aux pH alcalins [BIER et NORD (¹)].

La nature protéique commune de l'enzyme et du substrat rend possible la fixation d'un ion sur chacune de ces molécules. Il faut donc toujours examiner ces deux possibilités de fixation. Dans le cas de l'ammonium, les quelques données dont on dispose ne permettent pas d'éliminer la possibilité d'une action sur l'enzyme. On sait par exemple que NH_4^+ inhibe totalement certains enzymes tels la fructose diphosphatase (^{24 bis}). Dès que nous avons mis en évidence l'inhibition de la protéolyse de la lactoglobuline en

présence d'ammonium, nous avons donc cherché à savoir si l'action s'exerce sur l'enzyme ou sur le substrat ; cette question devait être résolue pour aborder l'étude quantitative de la cinétique en présence d'ammonium.

A. ACTION INHIBITRICE DE L'AMMONIUM : ASPECT QUALITATIF.

Au cours de ce travail, le procédé opératoire utilisé est, dans ses grandes lignes, le même que celui qui a servi dans le cas de l'ion calcium. Chaque fois que cela a été possible, nous avons suivi l'évolution de la protéolyse en fonction du temps par la méthode titrimétrique de LINDERSTRÖM-LANG. L'emploi de cette méthode dans des milieux contenant ClNH_4 nécessitait certaines précautions : tout d'abord, il convient de travailler dans des tubes soigneusement fermés afin d'éviter un départ de NH_3 . En outre, pour plus de sécurité, l'évolution des témoins a été suivie en fonction du temps à la même température pendant toute la durée de l'expérience ; en fait, à pH 7 et même à pH 8, on n'a jamais observé de variation supérieure aux erreurs expérimentales.

Les mesures sont généralement faites à pH 7 et à 35°. Toutefois, pour chaque série d'expériences, les conditions seront précisées. Dans presque toutes les expériences, NH_4^+ est utilisé sous forme de chlorure. Après addition de ClNH_4 , le pH et la concentration sont soigneusement ajustés, afin qu'ils soient identiques dans les deux solutions. Puis, le substrat est laissé en présence d'ammonium pendant au moins deux heures avant le début de la protéolyse.

1. Mise en évidence d'une inhibition.

L'hydrolyse d'une solution de lactoglobuline de concentration moyenne (11 mg/cm^3) est totalement inhibée par la présence de fortes concentrations d'ammonium ($0,23 \text{ M}$). Ce résultat a été observé à pH 7 et à pH 7,7 (voir fig. 14). On obtient le même résultat que la solution de ClNH_4 soit préparée à partir du produit R.P. directement ou à partir du même produit deux fois cristallisé.

$0,1 \text{ M}$ pH 7,6). La méthode titrimétrique habituelle ne pouvait pas être utilisée pour suivre la réaction dans ces conditions ; en effet, en tampon phosphate pH 7,6, la valeur initiale de titrage devient trop forte. Nous avons été conduit à utiliser une solution 5 % trichloracétique dans l'alcool 30 % qui donne des résultats quantitatifs (voir chapitre 1^{er}).

En tampon phosphate, on observe une inhibition très importante mais non totale pour une concentration d'ammonium qui, en tampon borate, inhibe

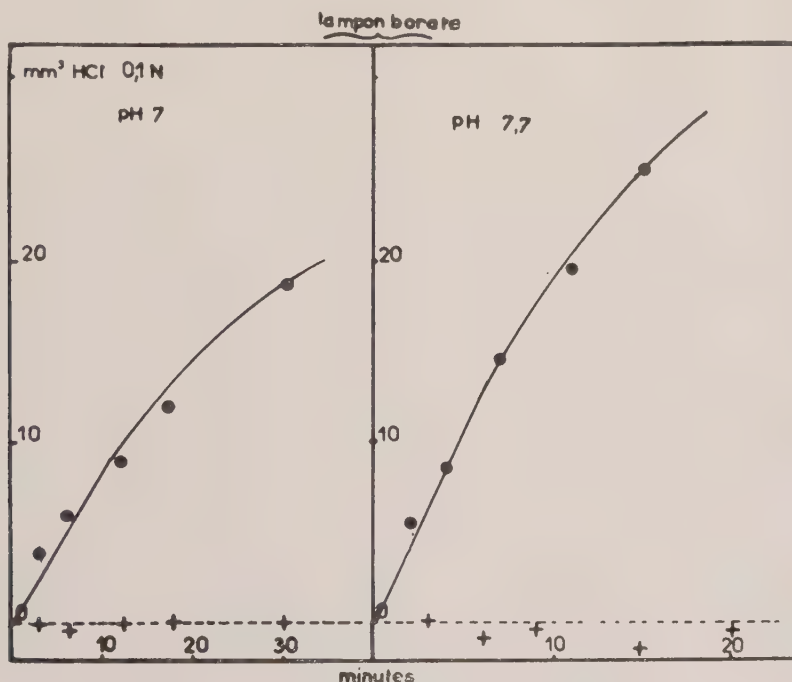


Fig. 14. — Mise en évidence de l'action inhibitrice de l'ammonium.

à gauche à pH 7,2 ($s_0 = 9,6 \text{ mg/cm}^3$; $e = 84 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$; $(\text{NH}_4^+) = 0,225 \text{ M}$).

à droite à pH 7,7 ($s_0 = 12 \text{ mg/cm}^3$; $e = 57 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$; $(\text{NH}_4^+) = 0,235 \text{ M}$).

Après avoir mis en évidence cette action inhibitrice de l'ammonium, nous avons étudié l'influence de différents facteurs : tampon, pH, anion lié à l'ammonium, etc.

2. Influence du tampon.

a) Tampon phosphate.

Les deux expériences précédentes ont été effectuées en tampon borate. Pour comparer l'effet obtenu lorsque la réaction se produit dans un autre milieu, on a choisi le tampon phosphate de SØRENSEN (phosphate disodique et phosphate monopotassique

totalément la réaction (voir fig. 15). La différence des résultats obtenus en tampon borate et en tampon phosphate peut être attribuée à une légère protection exercée par les ions phosphate ; nous discuterons plus loin ce résultat. Quoi qu'il en soit, l'action inhibitrice de NH_4^+ est encore très grande.

b) Tampon chlorure d'ammonium-ammoniaque.

La plupart des expériences de LINDERSTRÖM-LANG sur la protéolyse de la lactoglobuline ont été effectuées dans le tampon $\text{ClNH}_4\text{-NH}_4\text{OH}$ $0,1 \text{ M}$ pH 8,3 (⁶⁰, ⁶¹, ⁶²). On pouvait se demander si, dans ces conditions, la vitesse de protéolyse n'est pas diminuée

par l'ammonium du tampon. Nous avons donc comparé les vitesses d'hydrolyse en fonction du temps dans le tampon $\text{NH}_4^+-\text{NH}_3$ pH 8,3 avec les vitesses obtenues dans le tampon borate au même pH et à la même température (35°). Toutefois, la variation du pH du tampon de LINDERSTRÖM-LANG avec la température est assez importante (0,25 pH pour 10°) et il faut l'ajuster soigneusement à la température de 35°.

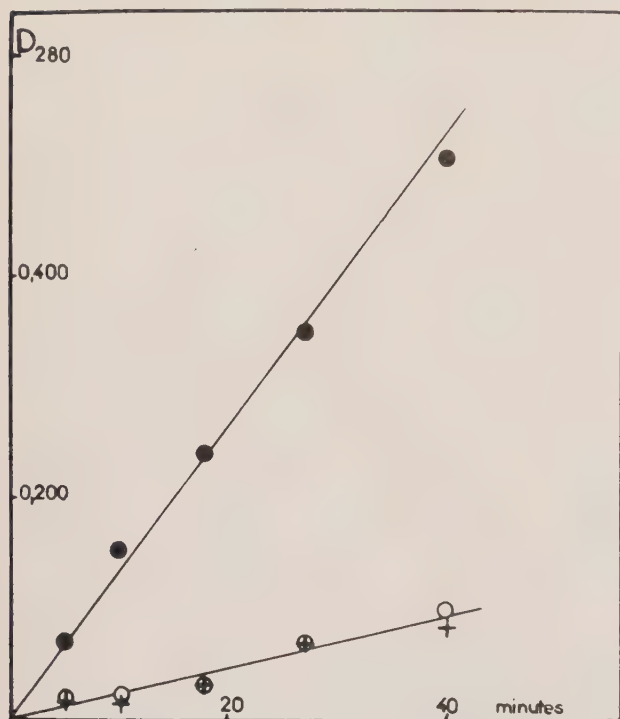


Fig. 15. — Influence de NH_4^+ sur la protéolyse de la lactoglobuline par la trypsine en tampon phosphate pH 7,6.
 $s_0 = 11,1 \text{ mg/cm}^3$; $e = 61 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$

● sans NH_4^+ ○ 0,22 M NH_4^+ + 0,27 M NH_4^+

Pour plus de sécurité, l'évolution de la protéolyse en fonction du temps a été suivie d'abord par la méthode titrimétrique, puis par la méthode spectrophotométrique après précipitation trichloracétique. Dans les deux cas, le résultat est identique : les courbes d'hydrolyse en fonction du temps en tampon borate et en tampon $\text{NH}_4^+-\text{NH}_3$ sont superposables. La protéolyse de la lactoglobuline par la trypsine ne subit donc aucune inhibition dans le tampon de LINDERSTRÖM-LANG à pH 8,3 et à 35°.

Ce résultat ne pouvait être attribué à une différence dans l'ionisation de l'ammonium entre pH 7 et pH 8,3. En effet, le pK de dissociation de NH_4^+

ayant une valeur de 9, la concentration à pH 8,3 de NH_4^+ (sous forme ionisée) est 0,074 M ; une telle concentration de NH_4^+ produit encore à pH 7 une inhibition appréciable (environ 80 % ; voir plus loin). Par conséquent, l'inhibition semble plutôt la conséquence d'une fixation de NH_4^+ par un groupe complètement dissocié à pH 8,3.

3. Influence du pH sur l'action inhibitrice de NH_4^+ .

Nous avons donc été conduit à étudier systématiquement l'action de NH_4^+ sur la protéolyse de la lactoglobuline à divers pH, pour une concentration qui inhibe totalement la réaction à pH 7 (0,19 M). Les concentrations de l'enzyme et du substrat étaient les mêmes pour toutes ces expériences ($e = 68 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$; $s_0 = 10,4 \text{ mg/cm}^3$). L'étude de la protéolyse en absence et en présence de NH_4^+ 0,19 M a été faite pour plusieurs valeurs de pH (depuis pH 7 jusqu'à pH 9) ; le pH du tampon de référence était mesuré préalablement à l'électrode d'hydrogène. Pour ces expériences, le tampon borate était préparé de la même manière que le tampon borate pH 7 (acide borique M/5, borax M/20, NaCl 0,1 M d'après PALITZSCH). La protéolyse est effectuée à 35°, on la mesure par la méthode spectrophotométrique après précipitation trichloracétique. Les courbes d'hydrolyse en fonction du temps permettent la comparaison des vitesses obtenues avec et sans NH_4^+ à pH 7,78 ; 8,01 ; 8,13 ; 8,21 ; 8,32 et 8,93 (voir fig. 3). On voit très nettement que l'effet de NH_4^+ qui était total à pH 7 diminue assez brusquement pour s'annuler complètement à pH 8,32. Au-delà de cette valeur, NH_4^+ ne semble plus exercer aucune inhibition sur la protéolyse de la lactoglobuline par la trypsine, comme le montre la figure 17. Par conséquent, on doit admettre que NH_4^+ se fixe sur un des groupes qui se dissocient dans cet intervalle de pH ; le pK de dissociation, correspondant à la moitié de NH_4^+ fixé, se place à pH 8,15. Ceci peut suggérer la fixation de NH_4^+ par les groupements histidine.

On pourrait penser que, en tampon phosphate, la dissociation des groupes fixant NH_4^+ commencerait à un pH légèrement inférieur.

4. Action du sulfate d'ammonium.

La diminution de la protéolyse sous l'influence de CINH_4 ne pouvait être attribuée qu'au cation d'après les résultats obtenus avec d'autres chlorures. Lorsque l'on utilise le sulfate d'ammonium, pour une concentration de 0,23 M NH_4^+ , on observe un arrêt total de la protéolyse analogue à ce que l'on observe en présence de chlorure. C'est donc bien à l'ion ammonium que l'on doit attribuer l'action inhibitrice dont nous allons maintenant chercher à définir la nature.

B. ACTION DE L'AMMONIUM SUR LE SUBSTRAT.

Nous rencontrons ici le même problème que celui qui s'est posé à propos du calcium : l'action inhibitrice s'exerce-t-elle sur l'enzyme ou sur le substrat ou résulte-t-elle d'une action sur chacune de ces deux protéines ? Dans le cas du calcium, la question a pu être résolue aisément par suite d'une différence dans la vitesse de fixation de cet ion sur la trypsine et sur la lactoglobuline. Nous avons donc commencé par chercher s'il existe une différence analogue dans

la vitesse de fixation de l'ion ammonium sur l'enzyme et sur le substrat.

1. L'action inhibitrice est très rapide.

On utilise un récipient à deux diverticules où des prélèvements sont effectués en fonction du temps [voir III, (⁹²)]. Par ce procédé, nous avons pu observer que l'inhibition se produit immédiatement : on obtient le même résultat, que l'enzyme ait été maintenu pendant trois heures en présence d'ammonium,

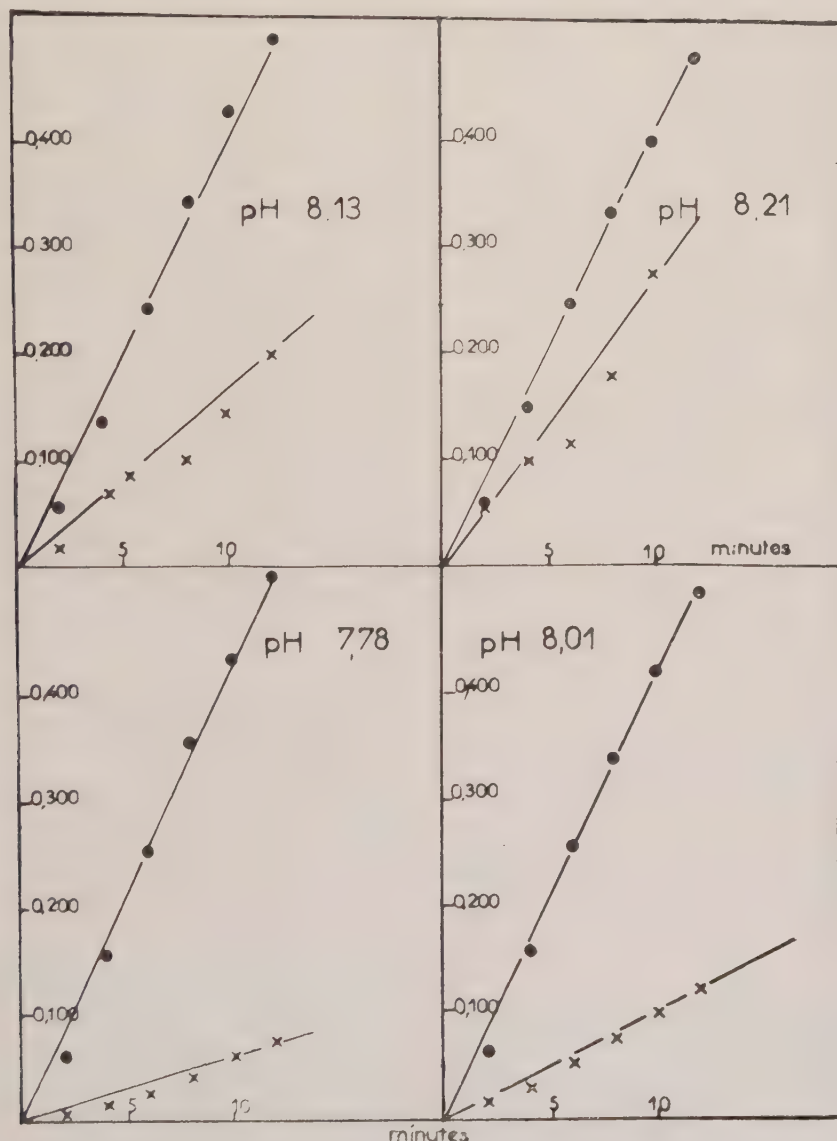


Fig. 16. — Vitesse d'hydrolyse de la lactoglobuline à différents pH, en absence (cercles noirs) ou en présence de NH_4^+ 0,2 M (croix noires)

$s_0 = 10 \text{ mg/cm}^3$; $c = 68 \text{ g/cm}^3$.

ou que celui-ci ait été ajouté au dernier moment. L'effet inhibiteur est donc très rapide.

2. Effet d'une nouvelle addition de trypsine en cours de protéolyse.

Dans les conditions qui conduisent à une inhibition totale ($0,25 \text{ M NH}_4^+$), si l'adjonction d'une quantité d'enzyme supplémentaire fait démarrer l'hydrolyse, c'est que l'inhibition s'exerce sur l'enzyme. L'expérience a montré que des quantités importantes d'enzyme (jusqu'à $1.880 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$) ajoutées en cours de réaction ne déplacent pas l'inhibiteur.

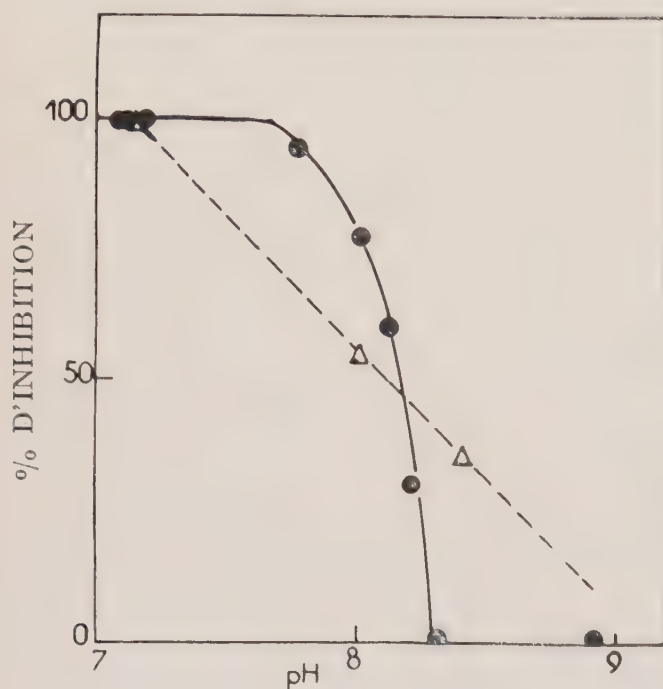


Fig. 17. — Influence du pH sur l'action inhibitrice de l'ammonium : courbe en traits pleins ; de la triméthylamine : courbe en pointillés.

3. Action de l'ammonium sur l'hydrolyse de divers substrats.

a) Caséine.

Nous avons suivi l'hydrolyse de la caséine par la technique de KUNITZ (¹³).

L'une des solutions est exempte de NH_4^+ , l'autre contient $0,245 \text{ M NH}_4^+$ qui est resté pendant trois heures en présence de substrat. Nous avons comparé l'effet de NH_4^+ sur la vitesse de protéolyse avec une concentration d'enzyme moyenne ($35 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$) et avec une concentration d'enzyme suffisamment forte

($93 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$) pour que la réaction s'achève rapidement. Les résultats obtenus dans l'un et l'autre cas n'indiquent, aux erreurs d'expérience près, aucune différence en présence ou en absence d'ammonium.

Toutefois, lorsque l'on maintient pendant 15 heures la caséine en présence d'ammonium à la glacière vers 1 à 2° , on observe une très légère inhibition (environ 10%) comme l'indique le tableau suivant :

Expérience n°	NH_4 en M/litre	v_0 en $D_{280}/\text{min.}$	c en γ/cm^3
1	0	0,0310	15,1
	0,24	0,0280	
2	0	0,0490	22,6
	0,22	0,0440	

On peut donc conclure, d'après la différence d'action sur la lactoglobuline et la caséine que l'inhibition observée est due à un blocage de la molécule de substrat. Elle ne s'exerce probablement pas sur l'enzyme.

b) Hémoglobine.

L'hémoglobine utilisée est préalablement dénaturée par l'urée conformément à la méthode d'ANSON (¹, ²). On mesure la protéolyse en fonction du temps d'après la technique décrite par cet auteur. La présence des ions ammonium ($0,2 \text{ M}$) n'entraîne qu'une très légère diminution de la vitesse d'hydrolyse de l'hémoglobine.

c) Sérumalbumine.

L'action de NH_4^+ $0,22 \text{ M}$ a été étudiée sur la sérumalbumine en tampon borate pH 7,1. L'hydrolyse de la protéine a été suivie par la méthode de LINDERSTRÖM-LANG. A cette concentration, l'ion ammonium supprime totalement la protéolyse de la sérumalbumine. Il existe une similitude de comportement entre la lactoglobuline et la sérumalbumine vis-à-vis de la fixation des ions ammonium.

L'action de l'ammonium s'exerce donc très probablement sur le substrat, et les différents substrats de la trypsine ne présentent pas la même susceptibilité pour fixer les ions NH_4^+ .

On peut aussi invoquer un autre argument en faveur de cette assertion. La réaction de la protéolyse de la lactoglobuline en présence d'ammonium $0,2 \text{ M}$ est totalement inhibée, pour une concentration moyenne de substrat de l'ordre de $10 \text{ mg}/\text{cm}^3$, quoique les concentrations de l'enzyme varient entre

44 γ/cm^3 et 1.880 γ/cm^3 . Si l'inhibition s'exerçait sur l'enzyme, on devrait d'autant plus avoir une inhibition totale pour les faibles concentrations d'enzyme utilisées lors de l'hydrolyse de la caséine. Or, la réaction s'effectue normalement. On a donc un certain nombre d'arguments excluant la possibilité d'une inhibition de l'enzyme.

C. ACTION DE L'AMMONIUM SUR L'ACTIVITÉ DE LA TRYPSINE.

Il a été prouvé que le calcium protège la trypsine contre son inactivation aux pH supérieurs à 5. On pouvait se demander si l'ammonium n'exerce pas une action analogue. Quoiqu'il soit sans action sur la trypsine dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placé, une possibilité d'action sur l'enzyme dans d'autres conditions n'était pas à exclure. C'est pourquoi nous avons voulu étudier son influence sur l'activité de la trypsine :

— à pH 7,5 qui est la région d'activité maximale de la trypsine ;

— à pH 5 qui est le pH de la solution que nous ajoutons au temps zéro de la réaction.

1. Action de l'ammonium sur la trypsine à pH 7,5.

Nous avons comparé les variations de l'activité de la trypsine en fonction du temps lorsque cet enzyme est placé à pH 7,56 (tampon phosphate) et à 35° en présence de CINH_4 0,32 M, ainsi qu'en absence de ce cation. Nous avons suivi la perte d'activité pendant cinq heures en présence et en absence d'ammonium. L'activité de la trypsine est mesurée par la méthode de KUNITZ (⁷³) ; elle est exprimée en unités trypsine (U.T.). Le tableau I résume

TABLEAU I

Perte d'activité en absence de CINH_4

Temps d'incubation	Activité exprimée en U.T.	Activité restante en %	Perte d'activité en %
0	$3,9 \cdot 10^{-3}$ (*)	100	0
10 minutes	$1,94 \cdot 10^{-3}$	50	50
1 heure	$0,8 \cdot 10^{-3}$	20,5	79,5
3 heures	$0,2 \cdot 10^{-3}$	5,1	94,9
5 heures 30 ...	$0,14 \cdot 10^{-3}$	3,6	96,4

Perte d'activité en présence de CINH_4

Temps d'incubation	Activité exprimée en U.T.	Activité restante en %	Perte d'activité en %
0	$3,9 \cdot 10^{-3}$	100	0
10 minutes	$2,75 \cdot 10^{-3}$	71	29
1 heure	$1,8 \cdot 10^{-3}$	46,4	53,5
3 heures	$0,8 \cdot 10^{-3}$	20,5	79,5
5 heures 30 ...	$0,54 \cdot 10^{-3}$	16,4	83,6

(*) L'activité $4 \cdot 10^{-3} \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$ est prise comme maximum d'activité de la trypsine que nous employons.

les résultats obtenus en fonction du temps d'incubation. Les résultats indiquent une perte d'activité importante au bout de cinq heures ; en présence de CINH_4 , cette perte d'activité est légèrement inférieure, mais la différence ne dépasse pas 10 %, ce qui est trop faible pour que l'on puisse conclure à une action protectrice de NH_4^+ . BIER et NORD (³) ayant mesuré l'activité de la trypsine au bout de 25 heures avec et sans ammonium, n'ont noté aucune différence. Ces résultats ne sont pas contradictoires, car la perte d'activité, bien qu'un peu ralentie par la présence des ions NH_4^+ doit être totale au bout de 25 heures dans les deux cas.

2. Action de l'ammonium sur la trypsine à pH 5.

Nous avons refait la même expérience, mais en ajoutant cette fois à la caséine l'enzyme conservé à pH 5 à 35° en présence ou non d'ammonium. Dans cette expérience, nous nous sommes contenté d'une seule mesure pour chaque temps d'incubation. La protéolyse est mesurée après 10 minutes de digestion de 1 cm^3 de caséine, la concentration de l'enzyme étant 9,85 γ/cm^3 . Le tableau II rend compte des résultats.

TABLEAU II

Temps d'incubation à 35° et à pH 5		D_{280}
1. sans CINH_4	0	0,231
	5 heures	0,237
2. avec CINH_4 0,39 M .	45 secondes	0,220
	15 minutes	0,210
	30 minutes	0,221
	60 minutes	0,213
	5 heures	0,200

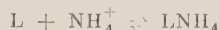
Au moins pendant une heure, NH_4^+ ne semble pas avoir d'action sur la trypsine ; les très légères différences observées sont de l'ordre des erreurs expérimentales.

D. ETUDE DE L'ÉQUILIBRE LACTOGLOBULINE-AMMONIUM.

1. Influence de diverses concentrations de NH_4^+ sur la vitesse de protéolyse de la lactoglobuline.

Puisque l'ammonium ne semble avoir aucun effet sur l'enzyme dans nos conditions d'expérience, la diminution de la vitesse de protéolyse observée lorsque ce cation est présent dans le milieu peut être considérée comme la conséquence de la fixation des ions NH_4^+ sur le substrat.

Tous les ions susceptibles d'être fixés sur le substrat n'agissent pas obligatoirement sur la protéolyse. On peut même considérer que seul intervient dans la partie initiale de la protéolyse, un ion fixé en position particulière par rapport à une liaison peptidique de la molécule de substrat. Il est légitime d'admettre que cette fixation de l'ammonium par le substrat est réversible ; en effet, nous avons vu qu'à pH 8,3, on n'observe plus aucun effet, même si la solution s'est trouvée préalablement à un pH inférieur. On peut donc écrire l'équilibre :



avec :

$$\frac{(L)(\text{NH}_4^+)}{(\text{LNH}_4)} = K_{\text{NH}_4}$$

(L) représentant la concentration de lactoglobuline et (NH_4^+) la concentration d'ammonium, K_{NH_4} la constante de dissociation apparente.

Lorsque l'on fait varier la concentration de NH_4^+ à partir de faibles concentrations (10^{-3} M) jusqu'à des concentrations assez fortes (0,25 M), on n'observe

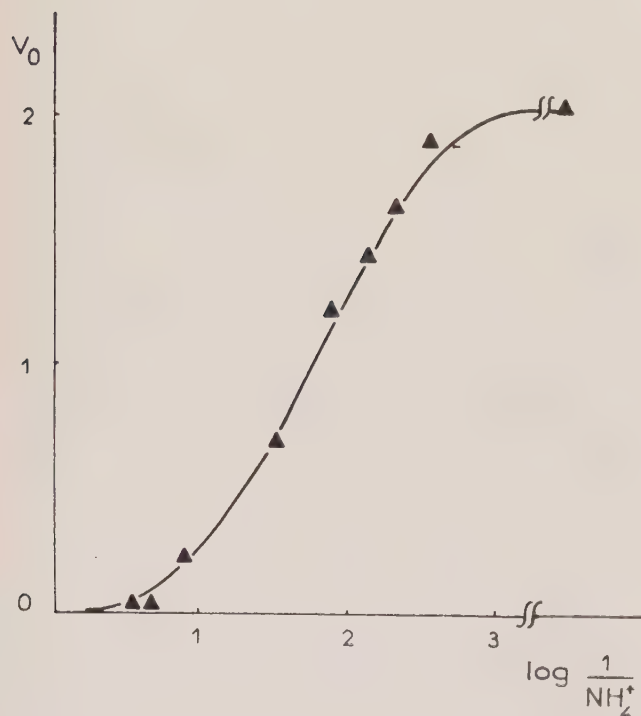


Fig. 18. — Détermination de pK_{NH_4} . — $s_0 = 12,25$ mg/cm³ ; $e = 134$ γ/cm³. — La courbe tracée représente la courbe théorique (voir texte), la dispersion des points expérimentaux autour de cette courbe reste dans la limite des erreurs expérimentales.

d'abord aucun effet, puis, à partir d'une concentration de $5 \cdot 10^{-3}$ M environ, la vitesse de protéolyse diminue de plus en plus et finit par s'annuler vers 0,2 M environ (tabl. III.). Alors qu'en présence de calcium la vitesse de protéolyse tendait vers une valeur limite non nulle, ici elle s'annule pour des concentrations relativement faibles de NH_4^+ . Autrement dit, dès que la molécule est saturée en NH_4^+ , elle n'est plus susceptible de subir l'attaque enzymatique.

La représentation semi-logarithmique $v_0 = f[\log 1/(\text{NH}_4^+)]$ donne une courbe dose-effet qui permet d'obtenir le pK_{NH_4} et la constante de dissociation K_{NH_4} correspondant à la demi-saturation de la molécule en ions NH_4^+ qui interviennent dans la vitesse de protéolyse. Le tableau III indique les résultats pour plusieurs concentrations de lactoglobuline ; les vitesses de protéolyse sont données à la fois en fonction de la concentration de NH_4^+ et du cologarithme de cette concentration.

On obtient finalement :

TABLEAU III

$s_0 = 6,38$ mg/cm ³ $e = 100$ γ/cm ³			$s_0 = 12,26$ mg/cm ³ $e = 134$ γ/cm ³		
(NH_4^+)	$\log \frac{1}{(\text{NH}_4^+)}$	v_0	(NH_4^+)	$\log \frac{1}{(\text{NH}_4^+)}$	v_0
0		1,4	0		2
0,00123	2,92	1,4	0,00275	2,56	1,9
0,00246	2,61	1,4	0,0046	2,337	1,64
0,0031	2,51	1,4	0,0074	2,13	1,42
0,00615	2,21	1,10	0,0128	1,89	1,28
0,007	2,16	1,12	0,0255	1,53	0,68
0,0123	1,92	0,85	0,128	0,89	0,24
0,0246	1,62	0,5	0,24	0,67	0
0,0615	1,21	0,2			
0,123	0,92	0,07			
0,24	0,60	0			

v_0 représente le nombre de liaisons peptidiques détruites par minute et par cm³ $\times 10^7$.

pour :

$$\begin{aligned} s_0 &= 6,38 \text{ mg/cm}^3 & pK_{\text{NH}_4} &= 1,82 \\ s_0 &= 12,26 \text{ mg/cm}^3 & pK_{\text{NH}_4} &= 1,80 ; 1,78 \end{aligned}$$

Les différences observées sont inférieures aux erreurs expérimentales. La valeur moyenne :

$pK_{\text{NH}_4} = 1,80 \pm 0,90$ correspond à :

$$K_{\text{NH}_4} = 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ M} \pm 0,2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$$

2. Nombre maximum d'ions NH_4^+ fixés par molécules de lactoglobuline.

Nous avons vu précédemment que la molécule de lactoglobuline fixe un certain nombre d'ions

calcium, mais un seul, placé en position particulière par rapport à une liaison peptidique sensible, a une influence sur la vitesse de protéolyse. Avant de discuter la signification de K_{NH_4} , nous avons d'abord cherché à déterminer par une méthode analytique directe le nombre d'ions fixés par molécule de substrat dans les conditions où nous avons entrepris la détermination de K_{NH_4} . Nous utilisons la méthode de LINDERSTRÖM-LANG qui permet d'apprécier le nombre de groupes titrés sur la molécule de lactoglobuline d'après la valeur initiale de titrage. Ce nombre varie avec la concentration de $ClNH_4$. Si l'on porte graphiquement l'inverse de ce nombre en fonction de l'inverse de la concentration d'ammonium, on obtient une droite dont l'intersection avec l'axe des ordonnées donne l'inverse du nombre maximum d'ions fixés, d'après la relation ⁽⁵⁾ :

$$\frac{\text{Prot. tot.}}{(\text{NH}_4^+) \text{ fixé}} = \frac{K}{m} \frac{1}{(\text{NH}_4^+)} + \frac{1}{m}$$

dans laquelle m représente le nombre maximum d'ions fixés par mole de protéine et K la constante de dissociation intrinsèque.

La figure 19 résume les résultats obtenus.

Par suite de la présence d'un excès d'ammonium nous pouvons admettre que la concentration de NH_4^+ libre est pratiquement égale à la concentration totale de NH_4^+ .

En extrapolant pour $1/(\text{NH}_4^+) = 0$, on trouve que le nombre maximum d'ions NH_4^+ fixés par molécule de substrat est égal à 12 ± 2 . La précision sur la pente n'est pas suffisante pour permettre de déduire la constante intrinsèque. Cette méthode est extrêmement peu précise puisqu'elle repose sur l'évaluation de faibles différences ; elle permet seulement d'apprécier un ordre de grandeur.

Discussion.

D'une part, la méthode titrimétrique montre que la molécule de lactoglobuline est susceptible de fixer plusieurs ions NH_4^+ . D'autre part, la variation de la vitesse de protéolyse en fonction de la concentration de NH_4^+ permet de déterminer une constante K_{NH_4} qui correspond à la demi-vitesse d'hydrolyse. La signification de K_{NH_4} trouvée de cette manière doit être discutée. Plusieurs cas peuvent, en effet, se présenter :

— ou bien tous les ions qui se fixent sur la molécule de substrat contribuent à modifier la vitesse de protéolyse ;

— ou bien l'un d'eux seulement, placé au voisinage d'une liaison peptidique sensible, intervient dans la partie initiale de la réaction. Il semble en effet assez

peu probable que les ions placés en d'autres points éloignés puissent exercer une influence assez forte.

Pour vérifier cette dernière hypothèse, nous avons comparé la courbe expérimentale avec la courbe théorique calculée en supposant qu'un seul ion fixé par molécule de lactoglobuline intervient dans la protéolyse et en prenant comme constante $K_{NH_4} = 1,5 \cdot 10^{-2}$ M. La figure 19 nous montre que ces deux courbes sont superposables.

On peut conclure qu'un seul NH_4^+ fixé en position particulière sur la molécule de lactoglobuline entraîne une diminution de la vitesse de protéolyse. La constante K_{NH_4} est bien la constante de dissociation d'un équilibre entre l'ion ammonium et un certain groupe de la molécule de lactoglobuline. Elle représente la constante d'inhibition de la réaction, constante d'inhibition d'un type un peu particulier

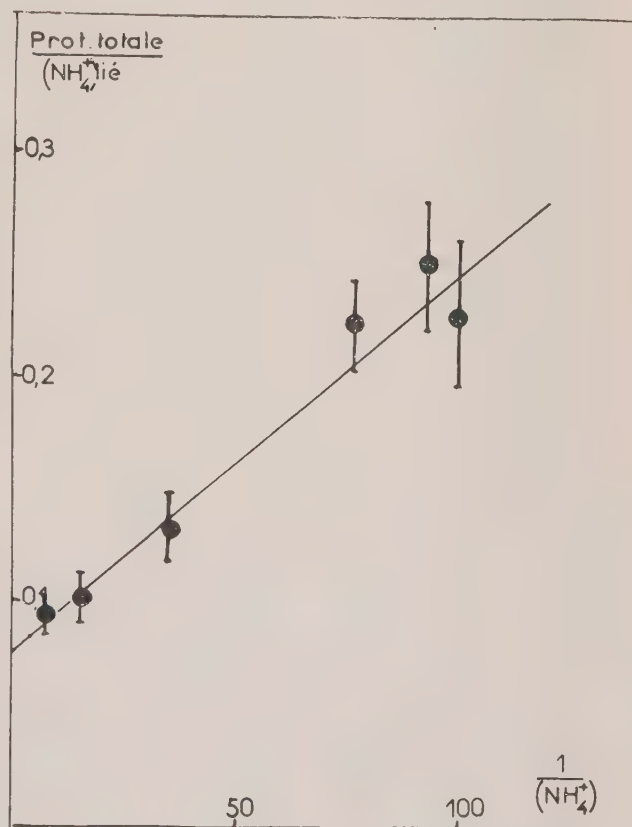


Fig. 19. — Détermination du nombre maximum d'ions NH_4^+ fixés par molécule de lactoglobuline.

puisque l'inhibiteur se fixe sur le substrat. D'autre part, puisque s n'est pas négligeable devant K_m , la méthode de détermination de K_{NH_4} n'est valable qu'à condition que la forme de l'inhibition soit non

compétitive. C'est ce que nous avons cherché à vérifier, quoique la constance de K_{NH_4} pour des concentrations de substrat variant du simple au double pouvait déjà le laisser prévoir.

E. FORME DE L'INHIBITION.

Nous venons de voir que l'inhibiteur agit en se fixant sur le substrat et non sur l'enzyme. Cette fixation est telle qu'au-delà d'une certaine concentration, la lactoglobuline ne peut plus être hydrolysée par l'enzyme. Nous avons vu que les différentes formes d'inhibition, compétitive, non compétitive ou « uncompetitive » (c'est-à-dire action de l'inhibiteur sur le complexe intermédiaire), conduisent aux mêmes formules que l'inhibiteur soit fixé sur l'enzyme ou sur le substrat. Si l'on utilise la représentation d'EADIE (26), la pente et l'intersection avec l'axe des vitesses prennent des valeurs caractéristiques suivant la forme d'inhibition impliquée dans la réaction [voir tabl. I (92)]. Toutefois, comme nous l'avons déjà fait remarquer, ces formules ne s'appliquent que tant que la concentration de l'enzyme est faible devant celle du substrat et tant que la concentration du substrat reste faible devant celle de l'inhibiteur, de sorte que celui-ci soit toujours en excès dans le milieu. Nous utilisons des concentrations telles que les équations classiques peuvent encore s'appliquer.

TABLEAU IV

CINH ₄ M/l	e γ/cm ³	v ₀ L.P. (*) min./cm ³ × 10 ⁷	s ₀ mg/cm ³	v' ₀ L.P. (*) min./cm ³ × 10 ⁷	v' ₀ /s ₀
0,0109	113	0,94	25,4	1,17	0,046
		0,74	13,2	0,925	0,070
		0,57	6,5	0,71	0,109
		0,36	3,05	0,45	0,147
0,026	141	0,6	16,2	0,6	0,037
		0,48	8,25	0,48	0,058
		0,35	4,05	0,35	0,086
		0,215	2,15	0,215	0,094
0,064	156	0,45	24,3	0,407	0,0165
		0,37	12,5	0,335	0,0267
		0,24	6,35	0,217	0,0342
		0,16	3,18	0,145	0,0426

(*) L.P. : liaisons peptidiques hydrolysées.

Nous avons donc étudié les variations de la constante de MICHAELIS complexe K'_m et de la vitesse maximum de protéolyse V'_m , en présence de différentes concentrations d'ammonium. L'étude cinétique a été faite pour trois concentrations de CINH₄ (0,0109 M ; 0,026 M ; 0,064 M). Le tableau IV indique les valeurs trouvées pour la vitesse initiale de protéolyse en fonction de la concentration de

substrat. Afin de pouvoir établir une comparaison, toutes les vitesses sont calculées pour 140 γ/cm³ d'enzyme ayant une activité de 3,9 U.T. ; nous appelons v'_0 la valeur obtenue.

Si l'on porte sur un même graphique les droites expérimentales $v'_0 = f(v'_0/s_0)$, ainsi que la droite correspondant à la cinétique en absence de NH₄⁺ calculée pour la même concentration d'enzyme, on trouve qu'elles sont parallèles (voir fig. 20). K'_m reste

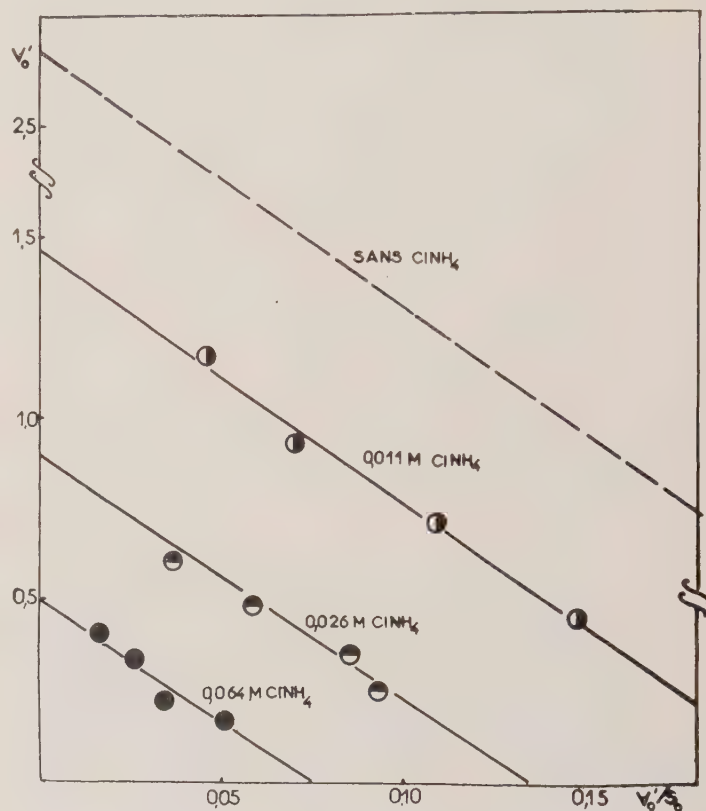


Fig. 20. — Nature de l'inhibition par l'ammonium. — Etude des droites $v'_0 = f(v'_0/s_0)$. — La parallélisme des droites montre nettement que le blocage de la lactoglobuline par l'ammonium est du type non compétitif ($e = 140 \gamma/cm^3$).

identique à K_m quelle que soit la concentration d'ammonium, ce qui prouve que l'inhibition est du type non compétitif ; autrement dit, les ions ammonium ne se fixent pas sur le même groupe du substrat que l'enzyme.

Toutefois, la précision n'était pas suffisante pour permettre la détermination de K_{NH_4} par cette méthode. En effet, la relation (2) (92) peut s'écrire :

$$K_{NH_4} = \frac{V'_m (NH_4^+)}{V'_m - V'_m} \quad (7)$$

Le calcul portant sur la différence de deux vitesses obtenues à 10 % près, une faible erreur sur la vitesse entraîne obligatoirement une erreur considérable sur K_{NH_4} . Mais nous pouvons calculer V_m d'une part d'après la relation (7) en utilisant la valeur de K_{NH_4} déterminée au moyen de la courbe $v_0 = f(\log 1/NH_4^+)$ ($K_{NH_4} = 1,5 \cdot 10^{-2} \pm 0,1 \cdot 10^{-2}$ mole/litre), d'autre part d'après la relation $V_m = k_s \cdot e$, k_s étant égal à $1,8 \cdot 10^{-5}$ liaisons peptidiques détruites par minute et par milligramme d'azote de l'enzyme et e à $140 \gamma/cm^3$. Le tableau ci-après montre qu'il existe un accord assez satisfaisant entre les valeurs de V_m obtenues par ces deux procédés :

(NH_4^+)	V'_m	V_m calc. d'après la relation (7)	V_m calc. d'après $V_m = k_s e$
0,0109 M	$1,46 \cdot 10^{-7}$	$2,6 \cdot 10^{-7}$	$2,7 \cdot 10^{-7}$
0,026	$0,9 \cdot 10^{-7}$	$2,5 \cdot 10^{-7}$	
0,064	$0,5 \cdot 10^{-7}$	$2,6 \cdot 10^{-7}$	

Les différences trouvées sont de l'ordre des erreurs expérimentales. On peut donc conclure que l'inhibition, bien que s'exerçant sur la molécule de substrat est de la forme non compétitive.

Action de la triméthylamine.

Nous avons vu que NH_4^+ se fixe sur un groupe de la protéine dont le pK de dissociation se place vers pH 8,15. Il était intéressant d'étudier l'action d'une base plus forte, la triméthylamine $N(CH_3)_3$. Elle est utilisée sous forme de chlorhydrate ; son titre est vérifié par dosage d'azote (*). On opère de la même manière qu'avec NH_4^+ . Les solutions sont généralement préparées à l'avance : c'est-à-dire que la triméthylamine reste en contact avec le substrat au moins trois heures avant le début de la réaction. La protéolyse est suivie par la méthode de LINDERSTRÖM-LANG à pH 7 et par la méthode spectrophotométrique à partir de pH 8. Une première expérience faite à pH 7,15 montre qu'une concentration de triméthylamine de 0,26 M inhibe totalement la réaction. Pour une concentration de 0,14 M, on a une inhibition de 85 %, ce qui est à 8 % près l'inhibition produite par une même concentration de NH_4^+ . Comme NH_4^+ , la triméthylamine ne produit aucune inhibition de l'hydrolyse de la caséine au même pH. Par conséquent, à pH 7,15, on constate une similitude d'action assez grande entre l'ion ammonium et la triméthylamine.

Deux autres expériences ont été effectuées à pH 8,01 et 8,42 (voir fig. 17) ; il y a une diminution

nette de l'action inhibitrice avec le pH ; mais cette diminution est plus lente que celle qui se produit avec NH_4^+ . Les courbes d'inhibition en fonction du pH obtenues avec les deux inhibiteurs se coupent à pH 8,15 qui correspond à 50 % d'inhibition aussi bien pour NH_4^+ que pour la triméthylamine. Ceci semble indiquer que les deux inhibiteurs se fixent sur les mêmes groupes de la lactoglobuline.

L'interprétation des résultats conduit aux remarques suivantes :

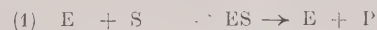
1. L'inhibition n'est probablement pas la conséquence d'un effet stérique ; en effet, d'une part la forme d'inhibition implique la possibilité de formation du complexe intermédiaire ; d'autre part si cela était, la molécule de triméthylamine, par suite de l'encombrement, devrait entraîner une inhibition plus forte que NH_4^+ . Or, il n'en est rien entre pH 7 et pH 8,15. Donc, il faut admettre que ces inhibiteurs agissent en changeant la répartition des charges au voisinage d'une liaison peptidique sensible.

2. La diminution de l'inhibition avec le pH peut provenir d'une variation de la charge de l'ion ajouté. Or, si cela était, on aurait une inhibition de 50 % à pH 9,2 avec NH_4^+ dont la constante de dissociation est $1,8 \cdot 10^{-5}$, et à pH 9,86 avec la triméthylamine dont la constante de dissociation est $7,4 \cdot 10^{-5}$. Cette variation ne peut provenir que d'une modification de la charge d'un groupe du substrat dont le pK de dissociation est 8,15 ; ce qui peut suggérer une fixation par un groupe histidine ou lysine. Mais l'hypothèse d'une fixation sur les groupes lysine doit être rejetée. En effet, la trypsine n'attaque une liaison peptidique qu'au voisinage d'une arginine ou d'une lysine (⁴⁴, ⁴⁵) ; et de plus, il semble établi que le ϵNH_2 doit être libre (⁴⁴), probablement pour permettre la fixation de l'enzyme. Or, une fixation de l'inhibiteur sur le même groupe que l'enzyme est incompatible avec le type d'inhibition non compétitif.

Il reste donc la possibilité d'une fixation par les groupes histidine qui se trouveraient au voisinage d'une liaison peptidique sensible.

F. ETUDE DES VARIATIONS AVEC LA TEMPÉRATURE : ÉNERGIE D'ACTIVATION.

Comme nous l'avons fait pour le calcium, nous avons cherché à déterminer les constantes thermodynamiques en présence de NH_4^+ . On est en présence d'un système relativement simple :



(*) Nous tenons à remercier M^{me} LABEYRIE qui a effectué ce dosage.

Deux processus principaux sont à envisager : la formation des complexes ES, SNH_4 , ESNH_4 et l'activation du complexe ES, la présence de NH_4^+ dans le système pouvant entraîner une modification de l'énergie d'activation.

Nous avons comparé les vitesses de protéolyse à diverses températures (fig. 21) ; l'étude est faite en tampon borate pH 7 et en présence de différentes concentrations de CINH_4 , l'hydrolyse est suivie par la méthode titrimétrique de LINDERSTROM-LANG.

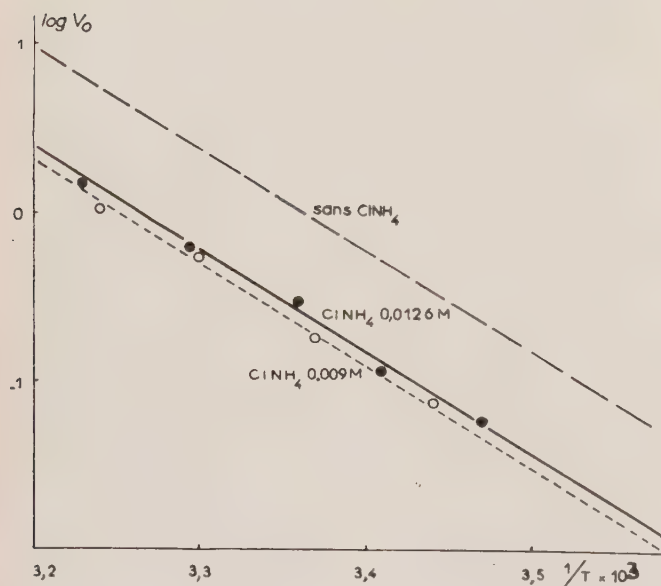


Fig. 8. — Détermination de l'énergie d'activation en présence d'ammonium ;

$\text{CINH}_4 = 0,0126 \text{ M}$ $s_0 = 8,15 \text{ mg/cm}^3$ $e = 365 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$
 $\text{CINH}_4 = 0,009 \text{ M}$ $s_0 = 6,37 \text{ mg/cm}^3$ $e = 245 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$

Le tableau V donne les résultats concernant la vitesse initiale de protéolyse à chaque température en indiquant pour chaque expérience la concentration de NH_4^+ utilisé.

TABLEAU V

$s_0 = 8,15 \text{ mg/cm}^3$ $e = 365 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$ $(\text{NH}_4^+) = 0,0126 \text{ M}$				$s_0 = 6,37 \text{ mg/cm}^3$ $e = 245 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$ $(\text{NH}_4^+) = 0,0089 \text{ M}$			
t	$1/T \cdot 10^3$	v_0	$\log v_0$	t	$1/T \cdot 10^3$	v_0	$\log v_0$
36°5	3,23	1,5	0,18	35°1	3,24	1,1	0,04
30°65	3,29	0,63	1,80	30°1	3,30	0,6	1,77
24°3	3,36	0,3	1,47	24°8	3,37	0,175	2,24
20°2	3,41	0,102	2,02	17°8	3,44	0,08	2,88
15°1	3,47	0,058	2,76				

v_0 est exprimé en liaisons peptidiques détruites par minute et par $\text{cm}^3 \times 10^7$.

La comparaison des droites $\log v_0 = f(1/T)$ avec et sans ammonium, montre que l'énergie d'activation est la même dans les deux cas. La pente de la droite correspond à $0,62 \pm 0,02$, c'est-à-dire la même valeur que celle que nous avons trouvée en tampon borate avec et sans calcium. Par conséquent, la présence d'ammonium n'entraîne pas de variation dans l'énergie d'activation du complexe intermédiaire.

Quoique la vitesse de protéolyse soit largement diminuée en présence d'ammonium, il semble toutefois légitime de dire que la constante k_s n'est pas modifiée. En effet, tout se passe comme s'il y avait moins de substrat, la lactoglobuline complexée à NH_4^+ n'étant plus hydrolysable. Dans ce cas, la constante k_s correspond au nombre de liaisons peptidiques détruites par minute et par mg d'azote sur les molécules de substrat non complexées avec l'ammonium ; elle garde donc son sens premier. Ceci implique évidemment l'hypothèse que la lactoglobuline ayant fixé un ammonium en une position particulière n'est plus hydrolysable, hypothèse que comporte le schéma de l'inhibition non compétitive. S'il en était autrement, c'est-à-dire si, à l'échelle moléculaire, le complexe lactoglobuline-ammonium était encore susceptible de subir l'attaque trypsique, quoique plus lentement, on n'obtiendrait jamais une inhibition totale, on serait ramené au cas du calcium. Par conséquent, l'hypothèse formulée ci-dessus nous semble la seule possible. En résumé, les constantes thermodynamiques correspondant à la première réaction du schéma ne sont pas modifiées par la présence d'ammonium.

D'autre part, nous avons vu précédemment que K_m n'est pas modifié par la présence d'ammonium quelle que soit sa concentration. Par suite, la formation du complexe ES ne subit pas non plus de modifications.

Des résultats précédents, on peut déduire que la formation du complexe SNH_4 ne varie pas avec la température :

$$\Delta H_2 \simeq 0$$

A partir de la valeur K_{NH_4} , soit $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ M/litre}$ on obtient la variation d'énergie libre qui accompagne la formation du complexe lactoglobuline-ammonium à 35° :

$$\Delta F_2 = -2550 \pm 50 \text{ cal./mole}$$

d'où la variation d'entropie :

$$\Delta S_2 = 8 \text{ U.E.}$$

Par conséquent, la fixation d'ammonium par la lactoglobuline est une réaction moins exergonique que la fixation de calcium, la différence est d'environ 1.000 cal.

Puisque l'on admet que la constante d'équilibre de la réaction (3) est la même que celle de la réaction (2), les constantes thermodynamiques qui définissent ces deux équilibres sont identiques.

CONCLUSIONS

A partir d'une concentration de ClNH_4 environ 0,2 M, on observe une inhibition complète de la digestion de la lactoglobuline par la trypsine, pour une concentration moyenne de substrat de l'ordre de 10 mg/cm³. Ce phénomène n'est pas influencé par la concentration de l'enzyme (e varie de 10 γ /cm³ à 1.880 γ /cm³). C'est l'ion NH_4^+ qui est responsable de cette action ; en effet, le phénomène existe dans les mêmes proportions en présence de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et l'on sait que d'autres chlorures n'inhibent pas cette protéolyse (NaCl).

L'action inhibitrice de NH_4^+ est très rapide ; elle se manifeste de la même manière si ClNH_4 est ajouté au dernier moment. On observe de grandes différences suivant les substrats utilisés. L'ammonium inhibe la digestion trypsique de la sérumalbumine dans les mêmes proportions que celle de la lactoglobuline ; mais il ne diminue que faiblement celle de l'hémoglobine dénaturée par l'urée et reste sans action sur l'hydrolyse de la caséine. On est donc amené à penser que l'action de NH_4^+ s'exerce sur le substrat et non sur l'enzyme. Cette manière de voir est confirmée par le fait que la diminution de l'activité de la trypsine à 35° en fonction du temps n'est pas diminuée d'une manière appréciable par la présence de NH_4^+ , que l'enzyme soit conservé à pH 7,5 ou à pH 5.

Ce phénomène ne subit pas de variations entre pH 7 et pH 7,7, mais entre pH 7,9 et pH 8,3, on observe une brusque diminution de l'inhibition : à pH 8,3, la protéolyse s'effectue normalement même en présence d'ammonium. Ceci explique pourquoi la vitesse d'hydrolyse de la lactoglobuline est la même dans le tampon $\text{NH}_3\text{-NH}_4^+$ utilisé généralement par LINDERSTRÖM-LANG et le tampon borate dans les mêmes conditions. Ce résultat ne peut être interprété comme la conséquence d'une dissociation de l'ammonium [à ce pH, on a encore 0,074 M sous forme NH_4^+ , ce qui produit à pH 7 une inhibition totale (85 %)], mais suggère plutôt la fixation des ions NH_4^+ par des groupements qui se dissocient dans cette zone de pH, probablement des groupes histidine. Des expériences faites avec la triméthylamine confirment ce résultat.

La variation de la vitesse de protéolyse en fonction de la concentration d'ammonium permet de déterminer la constante de dissociation du complexe lactoglobuline-ammonium. On obtient K_{NH_4} égal à $1,5 \cdot 10^{-2} \pm 0,2 \cdot 10^{-2}$ M/litre. Cet équilibre n'est pas modifié par la température. La formation du complexe s'accompagne d'une diminution d'énergie libre de 2.550 ± 50 cal. et d'une variation d'entropie de $+ 8$ U.E.

En résumé, l'ion ammonium diminue la vitesse de protéolyse de la lactoglobuline en produisant un blocage non compétitif du substrat : la fixation de NH_4^+ entraîne, au voisinage d'une liaison peptidique sensible, une modification des charges telle que le complexe lactoglobuline-ammonium n'est plus hydrolysable par la trypsine.

Les constantes thermodynamiques caractérisant la formation du complexe enzyme-substrat ne sont pas modifiées par la présence d'ammonium.

CHAPITRE V

INFLUENCE DE QUELQUES AUTRES CATIONS

A. ACTION DU MAGNÉSIUM.

Comme dans les cas envisagés précédemment, il existe une possibilité d'action sur l'enzyme et sur le substrat. Les quelques indications que l'on possède actuellement semblent prouver que la présence de Mg^{++} n'a aucune influence sur l'activité de la trypsine (3), pas même un effet protecteur semblable à celui que l'on attribue à l'ion calcium. Il n'entraîne aucune modification dans le degré de polymérisation de la molécule de trypsine ; alors que le calcium favorisait la transformation du dimère en monomère,

on n'observe qu'un seul composant à l'électrophorèse en présence de magnésium. On doit signaler que GREEN et NEURATH (33) trouvent que Mg^{++} augmente légèrement l'activité estérase de la trypsine quoiqu'en proportion plus faible que Ca^{++} , mais n'a pas d'influence sur l'activité protéinase.

L'influence de Mg^{++} sur un substrat protéique a été encore moins étudié. Toutefois, en comparant différentes mesures données par GORINI (33), nous pouvons déduire que Mg^{++} diminue la vitesse de la première partie de la protéolyse de la sérumalbumine par la trypsine dans les mêmes proportions que le

calcium ; mais dans la deuxième partie de cette réaction, l'influence de Mg^{++} est plus faible.

Dans une expérience préliminaire, nous avons mis en évidence une diminution importante de la vitesse de protéolyse de la lactoglobuline, lorsque Mg^{++} est présent à une concentration de 0,08 M.

Nous avons étudié l'allure de la cinétique lorsque l'on fait varier la concentration de magnésium. Nous admettons, d'après les données de BIER et NORO que Mg^{++} n'a pas d'effet sur l'activité de l'enzyme. La diminution de la vitesse doit donc être interprétée comme la conséquence de la fixation du magnésium sur le substrat. D'après les expériences précédentes, c'est en effet ce qui semble le plus fréquent dans le système lactoglobuline-trypsine. Pour une concentration moyenne de substrat ($s_0 = 9,4 \text{ mg cm}^3$), la vitesse initiale de protéolyse commence à diminuer pour 0,0084 M Mg^{++} , et atteint une valeur limite non nulle vers 0,04 M Mg^{++} . Comme nous avons utilisé la méthode titrimétrique de LINDERSTRÖM-LANG pour cette détermination, il était impossible d'employer de trop fortes concentrations de Cl_2Mg , car au-dessus de 0,08 M Mg^{++} , il se forme un précipité lors de l'addition de l'acide alcoolique, ce qui élimine toute possibilité de dosage. Pour des concentrations de Mg^{++} plus fortes (0,162 M), la détermination de la vitesse de protéolyse a été faite par la méthode spectrophotométrique. La concentration de l'enzyme et du substrat restaient les mêmes que pour la première série d'expériences. La vitesse de digestion ne s'annule pas ; elle reste égale, aux erreurs expérimentales près, à celle que l'on observe en présence de 0,04 M Mg^{++} .

Nous constatons donc un mode d'action un peu analogue à celui du calcium. Le complexe lactoglobuline-magnésium est encore susceptible de subir l'hydrolyse enzymatique.

Le tableau VI donne les différentes valeurs de v_0 en fonction de la concentration de Mg^{++} et du logarithme de $1/Mg^{++}$.

TABLEAU VI

v_0	$[Mg^{++}]$	$\log 1/Mg^{++}$
1,15	0	∞
1,15	0,00012	3,38
1,06	0,00084	3,08
0,76	0,0012	2,38
0,68	0,0084	2,08
0,32	0,042	1,38
0,38	0,162	0,79

v_0 est exprimé en liaisons peptidiques détruites par minute par $\text{cm}^3 \times 10^7$.

La représentation graphique de $v_0 = f(\log 1/Mg^{++})$ donne une courbe en S qui tend asymptotiquement dans sa partie inférieure vers une limite non nulle, comme dans le cas du calcium. Le pK_{Mg} calculé d'après la courbe a une valeur de $2,3 \pm 0,05$, ce qui donne une valeur de K_{Mg} égale à $5.10^{-3} \pm 0,5.10^{-3}$ M/litre.

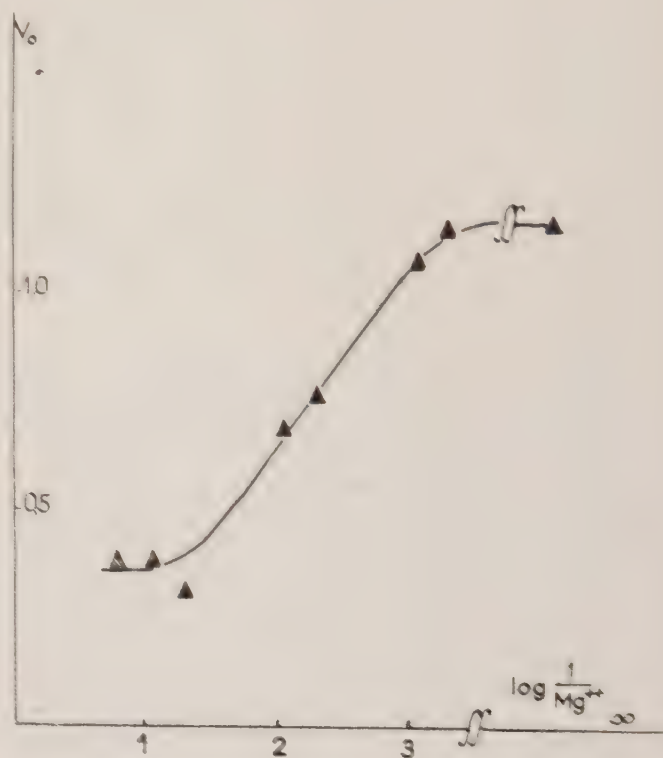


Fig. 9. — Détermination de pK_{Mg} en tampon borate pH 7,15.
 $s_0 = 9,36 \text{ mg cm}^3$ $e = 165 \text{ } \gamma \text{ cm}^2$.

La courbe expérimentale et la courbe théorique calculée dans le cas où K_{Mg} correspond à l'équilibre entre un groupe particulier de la molécule de lactoglobuline et un seul ion magnésium sont superposables. On peut en déduire qu'un seul ion Mg^{++} intervient dans la partie initiale de la protéolyse. La constante mesurée correspond à la constante de dissociation intrinsèque du complexe formé entre un groupe placé en position particulière sur la molécule de lactoglobuline et un ion Mg^{++} .

On constate donc, comme il fallait s'y attendre, une grande analogie entre le mode d'action des ions calcium et magnésium.

B. ACTION DE QUELQUES CATIONS MONOVALENTS : Na^+ ET K^+ .

A côté de NH_4^+ , quelques autres cations monovalents ont été étudiés, tels K^+ et Na^+ . Ils sont ajoutés sous forme de chlorure. Nous avons fait quelques mesures en présence de ClNa , à une forte concentration (0,22 M). L'allure de la protéolyse, dans ces conditions, était comparée avec celle que l'on obtient en tampon borate, pH 7, exempt de ClNa . La concentration de substrat est 4,5 mg/cm³ et celle de l'enzyme 149 γ /cm³. En présence de ClNa 0,22 M, on observe une légère diminution de la vitesse de protéolyse, mais seulement de l'ordre de 9 %, elle rentre pratiquement dans le cadre des erreurs expérimentales. D'autre part, en présence d'une telle quantité de sel, la force ionique de la solution est assez élevée ($\mu = 0,22$) et pourrait suffire à freiner un peu la réaction. Par conséquent, même à ces fortes concentrations, l'ion Na^+ n'a pratiquement aucun effet sur la vitesse de protéolyse.

Nous avons cherché à comparer les vitesses de digestion en présence de K^+ et de Na^+ . A cet effet, deux séries de tampons ont été préparées, un tampon borate de potassium (acide borique M/5, borate de potassium M/20, chlorure de potassium M/10) et un tampon borate de sodium qui est celui que nous utilisons généralement (acide borique M/5, borate de sodium M/20, chlorure de sodium M/10). Ces deux tampons étant à pH 7 et à la même force ionique.

Deux solutions de lactoglobuline sont préparées avec chacun de ces tampons et dialysées contre leur tampon respectif. Après dialyse, le pH est ajusté soigneusement dans les deux solutions, ainsi que la concentration de la lactoglobuline ($s_0 = 12,5$ mg/cm³). La même solution de trypsine est utilisée pour les deux expériences ($e = 150$ γ /cm³).

On suit la protéolyse en fonction du temps par la méthode de LINDERSTRÖM-LANG. Les résultats montrent que, aux erreurs d'expériences près, la protéolyse en présence de K^+ et de Na^+ suit la même cinétique.

Pas plus que le sodium, le potassium n'exerce d'action visible sur la vitesse de protéolyse de la lactoglobuline. Ces deux cations semblent se comporter d'une manière identique.

C. INTERACTION ENTRE PLUSIEURS CATIONS.

1. Action du calcium en présence de K^+ ou de Na^+

Le calcium (0,053 M) diminue la vitesse de protéolyse dans les mêmes proportions, que ce soit en présence de potassium ou de sodium. Il n'y a donc aucun antagonisme entre le calcium et le potassium, comme cela se voit dans de nombreux processus biologiques.

2. Action combinée de l'ammonium et du calcium.

On sait que dans un certain nombre de cas, le calcium a un effet protecteur contre l'inhibition par un métal lourd ou par d'autres inhibiteurs (38). On sait, d'autre part, que l'ammonium se fixe réversiblement sur la lactoglobuline et produit un blocage non compétitif du substrat. Le calcium agit différemment, sa fixation sur la lactoglobuline n'empêche pas la protéolyse ; il se forme simplement un nouveau complexe qui se digère moins vite que le substrat seul. D'après ces résultats, il semblait assez probable que la fixation de NH_4^+ et de Ca^{++} par la molécule de lactoglobuline ait lieu en des positions différentes. Toutefois, il était intéressant de faire agir ensemble ces deux cations.

Nous avons donc préparé une série de quatre solutions de lactoglobuline. Dans la première, on ajoute une certaine quantité de lactoglobuline en tampon borate sans addition supplémentaire d'aucun cation. Simplement une quantité déterminée d'eau bidistillée était ajoutée en fin de préparation pour ajuster la concentration de la solution ; on ajoute une même quantité de ClCa dans les trois autres solutions, la concentration finale de calcium dans le mélange est 0,045 M ; à partir de cette concentration, on obtient l'effet maximum. Le pH est soigneusement ajusté à 7,0. L'équilibre lactoglobuline-calcium s'établissant lentement, on attend environ 2 heures avant le début de la protéolyse.

Au temps zéro de la protéolyse (il se passe exactement dix secondes avant l'addition de la trypsine), on ajoute dans chaque tube des solutions 3 et 4, 0,102 cm³ d'une solution de ClNH_4 telle que sa concentration finale dans le mélange soit 0,160 M en 3 et 0,024 M en 4 ; dans les tubes des solutions 1 et 2, le ClNH_4 est remplacé par du tampon, pour que la concentration de lactoglobuline soit finalement la même dans les quatre expériences. On suit la protéolyse en fonction du temps par la méthode titrimétrique. La figure 22 résume les résultats obtenus. La courbe 1 correspond à la cinétique de protéolyse en absence de Ca^{++} et de NH_4^+ . La courbe 2 correspond à la cinétique de protéolyse en présence de Ca^{++} 0,045 M qui donne une diminution de vitesse d'environ 60 %, ce que l'on obtient généralement dans ces conditions. En 3, en plus de Ca^{++} 0,045 M, on a ajouté NH_4^+ à une concentration finale de 0,160 M. Donc Ca^{++} ne protège pas le substrat contre l'action de NH_4^+ . En 4, la protéolyse est effectuée en présence de calcium 0,045 M et d'ammonium 0,024 M. En absence de calcium, et pour une concentration de substrat du même ordre de grandeur, une telle concentration de NH_4^+ produirait une diminution de la vitesse de protéolyse d'environ 55 %. Dans la limite des erreurs expérimentales, on peut dire

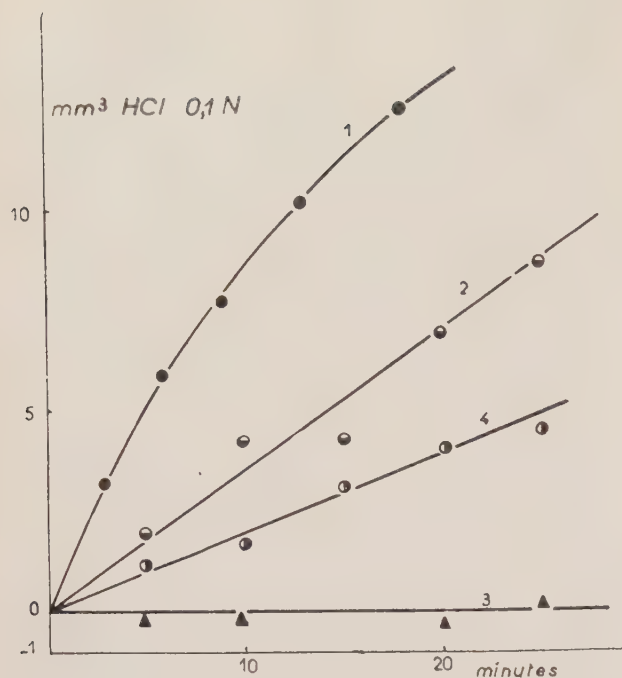
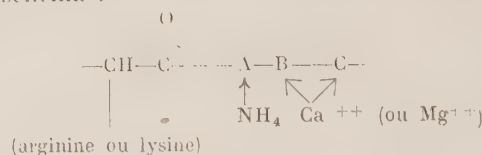


Fig. 22. — Action combinée de NH_4 et de Ca sur la protéolyse de la lactoglobuline à pH 7 ($s_0 = 11,3 \text{ mg/cm}^3$; $e = 146 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$) (voir texte).

que NH_4^+ produit le même effet sur la lactoglobuline seule et sur le complexe lactoglobuline-calcium. C'est ce que laissait prévoir la courbe 3. L'action des ions ammonium et calcium est donc additive.

Tous ces faits sont cohérents avec le résultat précédemment obtenu que les ions ammonium et calcium ne se fixent pas sur les mêmes groupes de la molécule de lactoglobuline. On peut se représenter la fixation des ions NH_4^+ et Ca^{++} sur cette molécule au voisinage d'une liaison peptidique sensible, selon le schéma :



Par suite de sa bivalence, Ca^{++} se fixerait sur deux groupes. Les ions Na^+ et K^+ se fixeraient à une distance telle de la liaison peptidique qu'ils n'auraient aucune influence sur la protéolyse. Dans une protéine comme la caséine, la succession des amino-acides dans la chaîne est différente de celle de la lactoglobuline. Le groupe A se trouverait donc assez loin de la liaison peptidique sensible et la fixation de NH_4^+ par ce groupe serait indifférente pour la protéolyse.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ANSON M. L. — *J. Gen. Physiol.*, 1938, **22**, 79.
- (2) ANSON M. L. et MIRSKY A. E. — *J. Gen. Physiol.*, 1933, **17**, 151.
- (3) BAIN J. A. et DEUTSCH H. F. — *Arch. Biochem.*, 1948, **16**, 221.
- (4) BERGMANN M. et FRUTON J. S. — *Adv. in Enzymol.*, 1944, **1**, 63.
- (5) BERGMANN M., FRUTON J. S. et POLLOCK H. — *Science*, 1937, **85**, 410.
- (6) BERGMANN M., FRUTON J. S. et POLLOCK H. — *J. Biol. Chem.*, 1939, **127**, 643.
- (7) BIER M. et NORD F. F. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1951, **33**, 320.
- (8) BIER M., TERMINIELLO L. et NORD F. F. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, **41**, 239.
- (9) BRAND E. et KASSELL B. — *J. Biol. Chem.*, 1942, **145**, 365.
- (10) BRAND E., SAIDEL M. J., GOLDWATER W. H., KASSELL B. et RYAN F. J. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1945, **67**, 1524.
- (11) BRIGGS E. et HALDANE J. B. S. — *Biochem. J.*, 1925, **19**, 338.
- (12) BUTLER J. A. V. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1941, **63**, 2968.
- (13) BUTLER J. A. V. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1941, **63**, 2971.
- (14) CANNAN R. K., PALMER A. H. et KIBRICK A. C. — *J. Biol. Chem.*, 1942, **142**, 803.
- (15) CARR C. H. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1953, **43**, 147.
- (16) CASEY E. J. et LAIDLER K. J. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 2159.
- (17) CECIL R. et OGSTON A. G. — *Biochem. J.*, 1949, **44**, 33.
- (18) CHANUTIN A., LUDEWIG S. et MASKET A. V. — *J. Biol. Chem.*, 1942, **143**, 437.
- (19) CHIBNALL A. C., REES H. W. et WILLIAMS E. F. — *Biochem. J.*, 1943, **37**, 354.
- (20) CHRISTENSEN J. — *C. R. Lab. Carlsberg, sér. chim.*, 1952, **28**, 39.
- (21) COHN E. J., LUETSCHER J. A., ONCLEY J. L., ARMSTRONG S. H. et DAVIS B. D. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1940, **62**, 3396.
- (22) DELEZENNE M. C. — *C. R. Soc. Biol.*, 1905, **59**, 479.
- (23) MACDONALD M. R. et KUNITZ M. — *J. Gen. Physiol.*, 1941, **25**, 53.
- (24) DUKE J. A., BIER M. et NORD F. F. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, **40**, 424.
- (24 bis) DE DUVE C. — *Ciba Foundation Coll. in Endocrinol.*, 1953, **6**, 23.
- (25) EADIE G. S. — *J. Biol. Chem.*, 1942, **146**, 85.
- (26) EADIE G. S. — *Science*, 1952, **116**, 688.
- (27) EBERSOLE E. R., GUTTENTAG C. et WILSON P. W. — *Arch. Biochem.*, 1943, **3**, 399.

- (28) ELKINS-KAUFMANN E. et NEURATH H. — *J. Biol. Chem.*, 1948, **175**, 893.
- (29) EYRING H. et STEARN A. E. — *Chem. Rev.*, 1939, **24**, 253.
- (30) FRIEDENWALD J. S. et MAENGWYN-DAVIES G. D. — *In a Symposium on the Mechanism of Enzyme Action*, Baltimore, 1954.
- (31) GIBSON K. D. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, **10**, 221.
- (32) GOLDSTEIN A. — *J. Gen. Physiol.*, 1943-1944, **27**, 525.
- (33) GORINI L. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1951, **7**, 318.
- (34) GORINI L. et AUDRAIN L. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1952, **9**, 180.
- (35) GORINI L. et AUDRAIN L. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, **10**, 570.
- (36) GORINI L. et FÉLIX F. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, **11**, 535.
- (37) GREEN M., GLADNER J. A., CUNNINGHAM L. W. et NEURATH H. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 2122.
- (38) GREEN M. et NEURATH H. — *J. Biol. Chem.*, 1953, **204**, 379.
- (39) GRONWALL A. G. — *C. R. Lab. Carlsberg*, 1942, **24**, 185.
- (40) HADIDIAN Z. et HOAGLAND H. — *J. Gen. Physiol.*, 1939, **23**, 81.
- (41) HALDANE J. B. S. — *Enzymes*, Longmans, Green and Co., London, 1930.
- (42) HARMON K. M. et NIEMANN C. — *J. Biol. Chem.*, 1949, **178**, 743.
- (43) HENRI V. — *Thèse*, Paris, 1903.
- (44) HOFMANN K. et BERGMANN M. — *J. Biol. Chem.*, 1939, **130**, 81.
- (45) HOFMANN K. et BERGMANN M. — *J. Biol. Chem.*, 1941, **138**, 243.
- (46) HOPSTEE H. J. — *Science*, 1952, **116**, 329.
- (47) JACOBSEN C. F. — *C. R. Lab. Carlsberg, sér. chim.*, 1947, **25**, 327.
- (48) JACOBSEN C. F. — *C. R. Lab. Carlsberg, sér. chim.*, 1949, **26**, 455.
- (49) KAUFMANN S., NEURATH H. et SCHWERT G. W. — *J. Biol. Chem.*, 1949, **177**, 793.
- (50) KLOTZ I. M. — *Arch. Biochem.*, 1946, **9**, 109.
- (51) KLOTZ I. M. — *Cold Spring Harbor Symp., Quant. Biol.*, 1950, **14**, 97.
- (52) KLOTZ I. M. — *In The Proteins*, Academic Press, New-York, 1953.
- (53) KUNITZ M. — *J. Gen. Physiol.*, 1947, **30**, 311.
- (54) KUNITZ M. et NORTHROP J. H. — *J. Gen. Physiol.*, 1934, **17**, 591.
- (55) LABEYRIE F. — Résultats non encore publiés.
- (56) LABEYRIE F. et YON J. — *J. Chim. Phys.*, 1953, **50**, 186.
- (57) LAIDLER K. J. et HOARE J. P. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 2489.
- (58) MACLEAN F. et HASTINGS A. B. — *J. Biol. Chem.*, 1935, **108**, 285.
- (59) LI C. H. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1946, **68**, 2746.
- (60) LINDERSTROM-LANG K. — *C. R. Lab. Carlsberg, sér. chim.*, 1927, **17**, n° 4.
- (61) LINDERSTROM-LANG K. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1950, **14**, 117.
- (62) LINDERSTROM-LANG K. et JACOBSEN C. F. — *C. R. Lab. Carlsberg, sér. chim.*, 1941, **24**, 1.
- (63) LINDLEY H. — *Adv. in Enzymol.*, 1954, **15**, 271.
- (64) LINEWEAVER H. et BURK B. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1934, **56**, 658.
- (65) LUDEWIG S., CHANUTIN A. et MASKET A. V. — *J. Biol. Chem.*, 1942, **143**, 753.
- (66) MICHAELIS L. et MENTEN M. L. — *Biochem. Z.*, 1913, **49**, 333.
- (67) MILLER L. — *C. R. Lab. Carlsberg, sér. chim.*, 1938, **23**, 45.
- (68) NELSON J. M. et BROOMFIELD G. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1924, **46**, 1025.
- (69) NEURATH H. — *II^e Congrès International de Biochimie*, Paris, 1952.
- (70) NEURATH H. et SCHWERT G. W. — *Chem. Rev.*, 1950, **46**, 70.
- (71) NORD F. F. et BIER M. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, **12**, 56.
- (72) NORTHROP J. H. — *J. Gen. Physiol.*, 1922, **5**, 263.
- (73) NORTHROP J. H., KUNITZ M. et HERRIOT R. M. — *Crystalline Enzymes*, 2nd Ed., Columbia University Press, 1948.
- (74) OGSTON A. G. — Communication personnelle.
- (75) PALMER A. H. — *J. Biol. Chem.*, 1934, **104**, 359.
- (76) POLIS B. D., SCHMUCKLER H. W., CUSTER J. H. et MAC-MEEKIN T. L. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 4965.
- (77) PORTER R. R. et SANGER F. — *Biochem. J.*, 1948, **42**, 287.
- (78) PUTNAM F. W. et NEURATH H. — *J. Biol. Chem.*, 1946, **166**, 603.
- (79) SCHWERT G. W. et EISENBERG M. A. — *J. Biol. Chem.*, 1949, **179**, 665.
- (80) SIZER I. W. — *Adv. in Enzymol.*, 1943, **3**, 35.
- (81) SORENSEN M. et SORENSEN S. P. L. — *C. R. Lab. Carlsberg, sér. chim.*, 1939, **23**, 55.
- (82) STEARN A. E. — *Erg. Enzymforsch.*, 1938, **7**, 1.
- (83) STEARN A. E. et EYRING H. — *J. Chem. Phys.*, 1937, **5**, 113.
- (84) STRAUS O. H. et GOLDSTEIN A. — *J. Gen. Physiol.*, 1943, **26**, 559.
- (85) UBER F. H. et MACLAREN A. D. — *J. Biol. Chem.*, 1941, **141**, 231.
- (86) VERBRUGGE F. — *J. Biol. Chem.*, 1943, **149**, 405.
- (87) WALEY S. G. et WATSON J. — *Biochem. J.*, 1953, **55**, 328.
- (88) WILLSTATTER R. et WALDSCHMIDT-LEITZ E. — *Ber.*, 1921, **54**, 2988.
- (89) WILSON P. W. — *In Respiratory Enzymes*, H. A. Lardy. Ed., Burgess Pub. Co., Minneapolis, 1949.
- (90) YON J. — *C. R. Ac. Sc.*, 1954, **233**, 284.
- (91) YON J. — *C. R. Ac. Sc.*, 1954, **239**, 448.
- (92) YON J. — *J. Chim. Phys.* (sous presse).
- (93) ZAMECNIK P. C., LAVIN V. I. et BERGMANN M. — *J. Biol. Chem.*, 1945, **158**, 537.

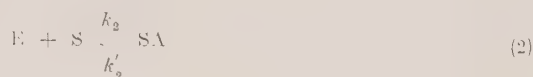
CONCLUSIONS

Ce travail est une étude quantitative de l'influence de plusieurs cations alcalins et alcalino-terreux sur la protéolyse de la lactoglobuline par la trypsine. Comme toute réaction enzymatique, cette protéolyse comporte, d'après la théorie de V. HENRI, deux processus essentiels : la formation réversible d'un complexe intermédiaire entre l'enzyme et le substrat, et la dissociation irréversible de ce complexe qui entraîne la formation des produits de réaction. La connaissance de la constante de MICHAELIS, lorsqu'elle peut être assimilée à l'inverse de la constante d'affinité de l'enzyme pour le substrat (et c'est le cas pour le système que nous étudions), permet de définir le premier processus, le second est défini par la constante spécifique d'apparition des produits d'hydrolyse à diverses températures. Tout d'abord, nous avons déterminé expérimentalement ces constantes. Puis nous avons cherché à préciser dans quelle mesure la fixation d'un cation par l'enzyme ou par le substrat peut modifier les différents processus.

L'action du calcium et celle de l'ammonium ont fait l'objet d'une étude détaillée. Toutes les expériences sont faites en tampon borate et à pH 7 ; les divers cations sont utilisés sous forme de chlorure.

Nous avons pu établir que le calcium modifie les deux processus de la réaction : la formation du complexe entre l'enzyme et le substrat et la vitesse d'apparition des produits d'hydrolyse. Cette vitesse diminue à mesure qu'augmente la concentration du calcium jusqu'à une valeur limite non nulle, par suite de la formation d'un complexe lactoglobuline-calcium. C'est en effet sur le substrat seulement que s'exerce l'action du calcium dans nos conditions expérimentales, son rôle de protecteur de l'enzyme n'intervenant pas. Quoique plusieurs ions calcium puissent se fixer sur une molécule de lactoglobuline (7 ± 2), il ressort de l'analyse des courbes de vitesse en fonction du logarithme de la concentration de calcium qu'un seul intervient dans la partie initiale de la protéolyse. Il nous a donc été possible de déterminer K_{Ca} , la constante de dissociation de ce complexe ; pour plusieurs concentrations de lactoglobuline, on retrouve la même valeur de K_{Ca} , soit : $3,5 \cdot 10^{-3} \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$ M/litre. L'équilibre lactoglobuline-calcium s'établit lentement (c'est pourquoi on laisse incuber la lactoglobuline en présence de calcium, environ deux heures avant le début de la protéolyse), ce qui nous a permis de connaître les constantes spécifiques : on obtient k , la vitesse de formation du complexe égale à $0,17 \pm 0,02$ M/l./sec. et k' la vitesse de dissociation égale à $6 \cdot 10^{-4} \pm 0,6 \cdot 10^{-4}$ sec $^{-1}$. Nous avons montré que cet équilibre n'est pas modifié par la température ($\Delta H \approx 0$) ; la formation du complexe substrat-calcium s'accompagne d'une variation d'énergie libre de -3.400 cal./mole ± 50 cal./mole et d'une variation d'entropie de $+11$ U.E.

Pour rendre compte de tous ces résultats, nous avons été conduits à adopter le schéma suivant :



dans lequel E, S et A représentent respectivement l'enzyme, le substrat et le calcium. On en déduit une expression assez complexe de la vitesse, mais qui se simplifie lorsque la concentration de calcium est grande ($Ca^{++} \geq 0,04$ M), ce qui permet de calculer les constantes K_a et k_a . On trouve respectivement $K_a = 5,8 \cdot 10^{-4} \pm 0,6 \cdot 10^{-4}$ M/litre et $k_a = 0,6 \cdot 10^{-5} \pm 0,06 \cdot 10^{-5}$ liaisons peptidiques détruites par minute et par mg d'azote.

Le complexe lactoglobuline-calcium se comporte donc comme une protéine définie, susceptible de subir l'attaque enzymatique, mais avec une vitesse trois fois plus faible que la protéine seule ; son affinité pour l'enzyme est aussi plus faible.

Les valeurs de la vitesse de protéolyse mesurées à plusieurs températures, en présence et en absence de calcium montrent que la présence de calcium ne modifie pas l'énergie d'activation de la réaction. Les différentes constantes thermodynamiques correspondant à la formation et à l'activation des complexes ont été calculées à 35°.

La variation d'entropie qui accompagne l'activation du complexe intermédiaire est légèrement plus faible pour ESA que pour ES. Quoique le niveau d'énergie à franchir reste le même, il semble donc que le calcium, en se fixant sur la lactoglobuline, supprime la liberté de quelques groupes d'atomes dans le complexe activé, ce qui ralentit la vitesse d'hydrolyse.

Un autre problème s'est posé à propos des constantes thermodynamiques définissant les processus d'activation de la réaction en tampon borate, sans calcium. Nous obtenons, en effet, une variation d'enthalpie ($\Delta H^\ddagger = 28.000 \text{ cal.}$) et une variation d'entropie fortement positives ($\Delta S^\ddagger = + 27 \text{ U.E.}$). Ces valeurs sont tout à fait différentes de celles que l'on trouve habituellement pour les réactions enzymatiques. L'expérience montre que ces résultats doivent être attribués à la présence des ions borate du tampon qui, au-dessous de 35°, produisent une inhibition non compétitive de la réaction ; en tampon phosphate, nous retrouvons, en effet, des valeurs normales ($\Delta H^\ddagger = 19.000 \text{ cal.}$; $\Delta S^\ddagger = - 3 \text{ U.E.}$).

L'action du magnésium est semblable à celle du calcium ; il se fixe aussi sur le substrat, et la constante de dissociation K_{Mg} du complexe lactoglobuline-magnésium est de $5.10^{-3} - 0,5.10^{-3} \text{ M.litre}$. Les affinités des deux ions pour la lactoglobuline sont donc très voisines.

Nous avons cherché si les ions Na^+ et K^+ exerçaient aussi une action sur la protéolyse de la lactoglobuline, mais nous n'avons constaté aucun effet. Parmi les autres cations monovalents, nous avons, au contraire, observé une action importante dans le cas de l'ammonium. En effet, à partir d'une concentration relativement faible (environ 0,2 M), l'ammonium produit une inhibition complète de la digestion de la lactoglobuline. Cette action est immédiate. Lorsqu'on l'étudie en fonction du pH, on constate qu'elle diminue brusquement entre pH 7,9 et 8,3, suggérant une fixation de NH_4^+ par des groupes qui se dissocient dans cette zone de pH. Il s'agit probablement de groupes histidine.

L'inhibition de la réaction par NH_4^+ n'est pas influencée par la concentration de l'enzyme. Mais on observe de grandes différences suivant les substrats utilisés. L'ammonium ne diminue que faiblement la protéolyse de l'hémoglobine par la trypsine et n'a pas d'action sur l'hydrolyse de la caséine. D'autre part, il n'a pratiquement pas d'influence sur le processus d'autodigestion de la trypsine. Cet ensemble de résultats conduit à conclure que NH_4^+ diminue la vitesse de protéolyse de la lactoglobuline en se fixant sur le substrat et non sur l'enzyme. La variation de la vitesse en fonction de la concentration d'ammonium permet de déterminer la constante de dissociation du complexe lactoglobuline-ammonium, sachant qu'un seul ion NH_4^+ par molécule de lactoglobuline intervient dans la partie initiale de la protéolyse. On obtient $K_{\text{NH}_4} = 1,5.10^{-2} - 0,2.10^{-2} \text{ M/litre}$ pour plusieurs concentrations de lactoglobuline. Le complexe lactoglobuline-ammonium ne subit plus l'hydrolyse trypsique. L'équilibre précédent n'est pas modifié par la température ($\Delta H \approx 0$). La formation du complexe s'accompagne d'une diminution d'énergie libre de $2.550 \pm 50 \text{ cal./mol.}$ et d'une variation d'entropie de $+ 8 \text{ U.E.}$

Les formules classiques impliquant une des formes d'inhibition compétitive ou non étant encore valables lorsque l'inhibiteur se fixe sur le substrat, nous avons constaté que le blocage de la lactoglobuline par NH_4^+ est du type non compétitif. Les ions NH_4^+ ne se fixent donc pas sur les mêmes groupes de la lactoglobuline que l'enzyme. D'autre part, ils ne modifient pas l'affinité de l'enzyme pour son substrat ; la vitesse d'apparition des produits de réaction se trouve diminuée quoique la constante spécifique reste inchangée, mais par suite de la fixation de NH_4^+ , il y a disparition d'une certaine quantité de substrat libre.

L'action de la triméthylamine a été comparée avec celle de l'ammonium ; elle produit à pH 7 les mêmes modifications que NH_4^+ ; la diminution de l'effet observé en fonction du pH est seulement plus lente, mais indique une fixation de l'amine sur les mêmes groupes de la protéine que NH_4^+ .

En présence d'ammonium, les constantes thermodynamiques de la réaction restent les mêmes.

De la fixation de calcium ou d'ammonium par la molécule de lactoglobuline résultent des effets assez différents. Alors que le complexe lacto-globuline-calcium est encore hydrolysable, quoique avec une affinité pour l'enzyme et une constante spécifique de vitesse plus faibles, le complexe lactoglobuline-ammonium ne l'est plus. Les actions de NH_4^+ et de Ca^{++} sont d'ailleurs additives ; ces deux cations ne se fixent donc pas au même point de la molécule de lactoglobuline. Tout se passe comme si NH_4^+ se fixait en un point assez proche d'une liaison peptidique sensible, produisant à cet endroit une modification des charges telle que l'éner-

gie nécessaire à l'activation du complexe enzyme-substrat devient beaucoup trop élevée pour que la réaction soit possible. Le calcium et le magnésium se fixeraient à une distance plus grande, ou entraîneraient une modification des charges moins sensible.

En résumé, les possibilités d'action d'un cation intervenant dans une réaction de protéolyse sont assez nombreuses. Il peut se fixer sur l'enzyme et modifier son activité dans le sens d'une inhibition ou d'une activation ; il peut même être indispensable à l'activité enzymatique. Il peut aussi, comme le montre ce travail, se fixer sur le substrat et modifier considérablement sa susceptibilité à subir l'attaque enzymatique la réaction devient plus difficile (Ca^{++} ou Mg^{++}) ou même impossible (NH_4^+).

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	7
<i>Chapitre I. — Préparations et techniques expérimentales</i>	7
A. Préparation des protéines utilisées	7
B. Techniques expérimentales	8
<i>Chapitre II. — Cinétique des réactions de protéolyse</i>	10
A. Réactions enzymatiques en absence d'inhibiteur : théorie de HENRI-MICHAELIS	10
B. Réactions enzymatiques en présence d'un inhibiteur	11
C. Cinétique de protéolyse de la lactoglobuline par la trypsine	12
<i>Chapitre III. — Action du calcium</i>	13
A. Aspect qualitatif	14
B. Etude de l'équilibre lactoglobuline-calcium	15
C. Influence de la concentration de l'enzyme sur la vitesse de protéolyse en présence de calcium ..	21
D. Etude de la digestion complète	21
E. Etude cinétique	21
F. Influence de la température	24
Conclusions	30
<i>Chapitre IV. — Action de l'ammonium</i>	32
A. Action inhibitrice de l'ammonium : aspect qualitatif	32
B. Action de l'ammonium sur le substrat	35
C. Action de l'ammonium sur l'activité de la trypsine	37
D. Etude de l'équilibre lactoglobuline-ammonium	37
E. Forme de l'inhibition	40
F. Etude des variations avec la température : énergie d'activation	41
Conclusions	43
<i>Chapitre V. — Influence de quelques autres cations</i>	43
A. Action du magnésium	43
B. Action de quelques cations monovalents : Na et K	45
C. Interaction entre plusieurs cations	45
BIBLIOGRAPHIE	46
CONCLUSIONS	48
DEUXIÈME THÈSE	52

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

LA CHÉLATION DANS QUELQUES RÉACTIONS ENZYMATIQUES

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 19 mars 1955.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PÉRÈS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH.

